

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Polimorfismo da redutase do Metilenotetrahidrofolato e  
sua relação com a variação genética da Fosfatase Ácida do  
Eritrócito como factores de risco para Osteoporose**

**Rafaela Coroa Dias Garcia Cabaça**

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Polimorfismo da redutase do Metilenotetrahidrofolato e  
sua relação com a variação genética da Fosfatase Ácida do  
Eritrócito como factores de risco para Osteoporose**

**Rafaela Coroa Dias Garcia Cabaça**

**Dissertação orientada por:**

**Orientador externo:**

Professor Doutor Manuel Bicho

Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa

**Orientadora interna:**

Doutora Deodália Dias

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

## Agradecimentos

Foram várias as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e às quais gostaria de expressar o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, gostaria de agradecer a oportunidade concedida e todo o apoio e esclarecimentos dados ao longo da realização deste trabalho.

À Doutora Deodália Dias, Professora e Coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, pela motivação e ajuda prestada ao longo deste ano.

Quero deixar também um especial agradecimento à Professora Maria José Lares e à Professora Doutora Cristina Monteiro, da Faculdade de Motricidade Humana, que me ajudaram e cederam bases de dados necessárias para uma maior robustez estatística neste estudo.

À Dra. Alda, pela ajuda prestada com a base de dados e análise estatística deste trabalho. À Dra. Joana Ferreira e à Dra. Irina Alho, por toda a disponibilidade e ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Ao restante pessoal do laboratório, Andreia, Técnica Conceição e Ângela queria agradecer toda a ajuda dada, bem como os conselhos e disponibilidade sempre presentes.

Aos meus colegas de laboratório nomeadamente, Joana Pereira e Diana Campelo, um muito obrigada por todo o companheirismo e ajuda sempre presentes ao longo do nosso ano de trabalho.

Gostaria de deixar um agradecimento à minha família, especialmente à minha mãe e irmã pelo amor, apoio e motivação incondicional. À Camila e ao Keiko, obrigada por existirem e tornarem os meus dias sempre mais sorridentes.

Aos meus grandes amigos Susana Rocha, Patrícia Faivre, Joana Ribeiro, Tiago Rodrigues, um muito obrigada por toda a amizade, apoio e motivação sempre presentes ao longo da vida e que significa tanto para mim.

A todos, um sincero obrigado por tornarem possível a conclusão desta etapa tão importante.

## Resumo

A osteoporose é uma doença multifactorial cuja interacção entre factores genéticos e ambientais leva à redução da densidade mineral óssea. A sua fisiopatologia encontra-se associada a uma desregulação dos mecanismos de remodelação óssea, quer por aumento de reabsorção óssea via osteoclastos, quer por diminuição da sua formação via osteoblastos.

A metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima chave do metabolismo da homocisteína, responsável pela remetilação da homocisteína a metionina. A variante T do polimorfismo C677T do MTHFR tem sido associada a um aumento dos níveis de homocisteína, estando estes valores associados à ocorrência de osteoporose bem como ao aumento da ocorrência de fracturas.

A fosfatase ácida do eritrócito locus 1 (ACP1) é uma enzima citoplasmática implicada na regulação do metabolismo, crescimento, mobilidade e adesão celulares, através do controlo dos processos de fosforilação de receptores e proteínas de adesão. Foi demonstrada a importância desta enzima no metabolismo ósseo na medida em que modula a actividade da Src cinase durante a diferenciação dos osteoblastos. A subexpressão de ACP1 aumenta a actividade da Src cinase levando a uma diminuição da diferenciação osteoblástica e, consequentemente, a um desequilíbrio nos mecanismos de remodelação óssea.

Existe também uma associação entre o polimorfismo C677T do MTHFR e a actividade da ACP1 na medida em que esta última activa a degradação de FAD, cofactor do MTHFR.

Os esteróides sexuais têm um papel importante no desenvolvimento ósseo e são bons candidatos para estudar o desenvolvimento da osteoporose. A catecol-O-metiltransferase (COMT) tem um polimorfismo funcional G→A que resulta numa substituição de valina por metionina no codão 158. Esta substituição de aminoácidos leva a uma diferença de 60-75% na actividade enzimática entre as variantes existentes.

Os objectivos deste trabalho foram caracterizar as frequências de três polimorfismos genéticos, MTHFR, ACP1 e COMT em DNA genómico obtido de sangue periférico num grupo de indivíduos com densidade mineral óssea diminuída e num grupo controlo; determinar a relevância dos polimorfismos analisados com o

aparecimento da doença e relacionar os resultados obtidos com a obesidade e algumas co-morbilidades associadas.

Como conclusões deste estudo destacam-se: uma tendência para o aumento de indivíduos com doença com genótipos AC e BC do polimorfismo da ACP1. O genótipo AC mostrou um maior risco relativo para o aparecimento da doença, com valores ajustados para a obesidade. No polimorfismo do MTHFR, verificou-se que para um IMC > 25 há uma diminuição no número de indivíduos com doença, para todos os genótipos, sugerindo que a obesidade é um factor protector em relação ao aparecimento da doença. Relativamente à COMT, apenas se registou uma tendência na análise do risco relativo para associação entre os genótipos da COMT e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade, para o genótipo HL (heterozigótico).

**Palavras-chave: Osteoporose, MTHFR, ACP1, COMT, PCR RFLP**

## Abstract

Osteoporosis is a multifactorial disease in which the interaction between genetic and environmental factors leads to reduced bone mineral density. Its physiopathology is associated with a deregulation of the mechanisms of bone remodeling, either by increased bone resorption via osteoclasts or by decreasing its formation via osteoblasts.

MTHFR is a key enzyme in homocysteine metabolism, responsible for the remethylation of homocysteine to methionine. The T variant of MTHFR C677T polymorphism has been associated with increased homocysteine levels, these values being associated with the occurrence of osteoporosis as well as the increased incidence of fractures.

ACP1 is a cytoplasmic enzyme involved in the regulation of metabolism, growth, motility and cell adhesion by controlling the processes of phosphorylation of receptors and adhesion proteins. It is certain the importance of this enzyme in bone metabolism as it modulates Src kinase activity during osteoblasts differentiation. The decreased expression of ACP1 increases Src kinase activity leading to a decrease in osteoblasts differentiation and, consequently, an unbalance in the bone remodeling mechanisms.

Previous studies have also shown an association between the MTHFR C677T polymorphism and the activity of ACP1 as it this last activates the FAD degradation, cofactor of MTHFR.

The sex steroids have an important role in bone development and are good candidates for studying the development of osteoporosis. The functional COMT has a G →A polymorphism resulting in a substitution of valine to methionine at codon 158. This amino acid substitution leads to a difference of 60-75% in enzyme activity between the existing variants.

The aims of this study were to characterize the frequencies of three polymorphisms, MTHFR, and COMT ACP1 in genomic DNA extracted from peripheral blood in a group of subjects with decreased bone mineral density and a control group, to determine the relevance of the polymorphisms analyzed with the appearance of disease and relate the results to obesity and certain associated comorbidities.

As conclusions of this study are: a tendency to increase in subjects with chronic genotype AC and BC ACP1 polymorphism. The AC genotype showed an increased

relative risk for the onset of disease, with values adjusted for obesity. In MTHFR polymorphism, it was found that for a  $IMC > 25$  there is a decrease in the number of individuals with the disease, for all genotypes, suggesting that obesity is a protective factor against the onset of disease. Regarding COMT, there was only a trend analysis of the relative risk for association between COMT genotypes and susceptibility associated with osteoporosis, adjusted for obesity, for the HL genotype (heterozygous).

**Keywords:** Osteoporosis, MTHFR, ACP1, COMT, PCR RFLP

## Lista de Abreviaturas

ACP1 – fosfatase ácida do eritrócito locus 1  
ANOVA - análise de variância  
BMD – densidade mineral óssea  
bp – pares de bases  
COMT – catecol-O-metiltransferase  
CVD – doença cardiovascular  
DXA - densitometria óssea de energia dupla  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
dNTPs – desoxirribonucleotidos  
*f / s*- fast / slow  
F / R – forward / reverse  
FRAX - *World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool*  
GR – glutathione redutase  
Hcy - homocisteína  
HDL - lipoproteínas de alta densidade  
HOMA - modelo de avaliação da homeostase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio  
IL – interleucina  
IMC - índice de massa corporal  
IOF - Fundação Internacional de Osteoporose  
kDa – kilodalton  
kg – kilograma  
l - litro  
LDL - lipoproteínas de baixa densidade  
LMW-PTP – *low molecular weight protein tyrosine phosphatase*  
m<sup>2</sup> – metro quadrado  
M-CSF - factor de estimulação de colónias de macrófagos  
min - minuto(s)  
ml - mililitro  
mM – milimolar  
mmol - milimole



MTHFR – metilenotetrahidrofolato redutase  
ng – nanograma  
nm – nanómetro  
NO – óxido nítrico  
OPG - osteoprotegerina  
PCR-RFLP - Reacção em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.  
pmol – picomole  
PTH – hormona da paratiróide  
PTP- Proteína Tirosina Fosfatase  
RANKL - receptor activador do factor nuclear do ligando Kappa-B  
s – segundos  
SAM - S-adenosilmetionina  
SNP- *single nucleotide polymorphism*  
tHcy – homocisteína total  
TNF - factor de necrose tumoral  
U - unidade  
UV - radiação ultravioleta  
WHO – Organização Mundial de Saúde  
µg - micrograma  
µL – microlitro  
5-MTHF - 5-metiltetrahidrofolato

## **Lista de Figuras**

Figura 1 – Estrutura do osso “saudável”, à esquerda; estrutura do osso osteoporótico, à direita.

Figura 2 – Linhas celulares que derivam de uma célula estaminal do mesênquima.

Figura 3 – Mecanismos reguladores da diferenciação e actividade dos osteoclastos.

Figura 4 – Estrutura tridimensional da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (ACP1).

Figura 5 - Organização do gene ACP1.

Figura 6 - Representação esquemática dos ciclos do folato e metabolismo da homocisteína.

Figura 7 - Localização do gene que codifica a catecol-O-metiltransferase.

Figura 8 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP da ACP1.

Figura 9 - Representação gráfica da distribuição dos genótipos da ACP1 em relação à classificação quanto à doença.

Figura 10 - Electroforese em gel de agarose a 4% de fragmentos de PCR-RFLP do MTHFR.

Figura 11- Representação gráfica da distribuição dos genótipos do MTHFR em relação à classificação quanto à doença.

Figura 12 - Electroforese em gel de agarose a 4% de fragmentos de PCR-RFLP da COMT.

Figura 13 – Representação gráfica da distribuição dos genótipos da COMT em relação à classificação quanto à doença.

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse dos polimorfismos do MTHFR, ACP1 e COMT.

Tabela 2 - Condições de amplificação utilizadas no método de PCR para cada polimorfismo/mutação.

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizados na digestão dos fragmentos amplificados e genótipos possíveis com as bandas correspondentes.

Tabela 4 - Genótipos da ACP1 esperados e bandas correspondentes.

Tabela 5 – Características dos grupos controlo (indivíduos saudáveis) e em estudo (indivíduos com osteopénia e osteoporose).

Tabela 6 -Correlação de Spearman entre parâmetros para os indivíduos com doença e controlo.

Tabela 7 - Frequências genótípicas do polimorfismo ACP1 nos indivíduos controlos e doentes (osteopénia + osteoporose).

Tabela 8 - Frequências genótípicas do polimorfismo ACP1 nos indivíduos controlos e doentes (osteopénia + osteoporose), separando a amostra pela condição de menopausa.

Tabela 9 – Relação entre os genótipos da ACP1 e a sua actividade enzimática.

Tabela 10 - Risco relativo para associação entre os genótipos da ACP1 e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

Tabela 11 - Correlação de Spearman entre a Osteocalcina, Fosfatase alcalina, Glicémia, Insulinémia e *HOMA* para os indivíduos com doença, em genótipos *slow* e *fast* da ACP1.

Tabela 12 - Relação entre os genótipos da ACP1 e o glutathione redutase.

Tabela 13 - Frequências genótípicas do polimorfismo MTHFR nos indivíduos controlo e doentes (osteopénia e osteoporose).

Tabela 14 - Risco relativo para associação entre os genótipos do MTHFR e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

Tabela 15 – Relação entre os genótipos do MTHFR e a actividade da ACP1.

Tabela 16 - Correlação de Spearman entre a Osteocalcina, Fosfatase alcalina, Glicémia, Insulinémia e *HOMA* para os indivíduos controlo e doentes, nos genótipos do MTHFR.

Tabela 17 - Relação entre os genótipos do MTHFR e o glutathione redutase.

Tabela 18 - Frequências genóticas do polimorfismo COMT nos indivíduos controlos e doentes (osteopénia + osteoporose).

Tabela 19 - Risco relativo para associação entre os genótipos da COMT e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

## **Publicações / Apresentações realizadas durante este trabalho:**

- Ferreira J., **Cabaça R.**, Barbosa A.P., Marinho C., Nobre E., Gonçalves A., Simões V., Carvalho M.R., Camolas J., Vieira J., Dragomir M., Carmo I., Bicho M., Mascarenhas M.R. (2012), Susceptibilidade para o desenvolvimento de osteoporose: estudo de associação do polimorfismo da fosfatase ácida do eritrócito e sua relação genótipo/fenótipo enzimático.
- Apresentação realizada no VIII Congresso Português de Osteoporose, SPODOM, Março de 2012.
- Monteiro, C.P., **Cabaça, R.**, Moreira, H., Baptista, M.F., Laires, M.J., Bicho M, Sardinha, L.B. (2012), Susceptibilidade para o desenvolvimento de osteoporose: estudo de associação com os polimorfismos da catecol-O-metil transferase. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 7(2):81
- Apresentação realizada no XIV Congresso Português de Endocrinologia, SPEDM, Janeiro de 2013.

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Publicações / Apresentações realizadas durante este trabalho.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. A doença.....	1
1.2. Osteoporose e a Doença Cardiovascular.....	3
1.3. Osteoporose e Obesidade.....	5
1.4. Diagnóstico e Factores de risco .....	9
1.5. Fisiopatologia da perda de massa óssea.....	10
1.6. Terapêutica .....	12
1.7. Polimorfismos genéticos em estudo.....	12
1.7.1. ACP1 – Fosfatase Ácida do eritrócito ou Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP).....	13
1.7.2. MTHFR - Metilenotetrahydrofolato Redutase.....	15
1.7.3. COMT - Catecol- <i>O</i> -metiltransferase .....	18
2. Objectivos .....	20
3. Materiais e métodos.....	21
3.1. População em estudo .....	21
3.1.1. Amostras .....	21
3.1.2. Dimensão da Amostra .....	21
3.2. Quantificação e determinação da pureza do DNA .....	21
3.3. Genotipagem dos polimorfismos MTHFR, ACP1 e COMT por PCR-RFLP.....	22
3.3.1. Polimorfismo C677T do MTHFR C677T (PCR – RFLP) .....	23
3.3.2. Polimorfismo genético da ACP1 (PCR – RFLP) .....	25
3.3.3. Polimorfismo Val158Met da COMT (PCR – RFLP) .....	25
3.4. Análise Estatística .....	26

4. Resultados.....	27
4.1. Características da população estudada.....	27
4.2. Genotipagem dos polimorfismos genéticos e perda de massa óssea por PCR-RFLP .....	29
4.2.1. ACP1 – Fosfatase Ácida do eritrócito ou Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP).....	29
4.2.2. Polimorfismo do MTHFR C677T.....	35
4.2.3. Polimorfismo da COMT Val158Met.....	39
5. Discussão .....	41
6. Conclusão.....	51
7. Bibliografia.....	53

## 1. Introdução

### 1.1 A doença

A osteoporose, que significa literalmente "osso poroso", é uma doença na qual a densidade e a qualidade do osso são reduzidas (International Osteoporosis Foundation, 2011)

Esta é a doença esquelética crónica mais comum, caracterizada pela redução da massa óssea, deterioração crónica da microarquitetura óssea e aumento do risco de fracturas (Marini & Brandi, 2010; McLeod & Johnson, 2011; Rachner *et al*, 2011).



**Figura 1** – Estrutura do osso “saudável”, à esquerda; estrutura do osso osteoporótico, à direita.  
(adaptado de International Osteoporosis Foundation, 2011)

A perda de massa óssea ocorre "silenciosamente" e progressivamente. Muitas vezes não há sintomas até que a fractura ocorra pela primeira vez (International Osteoporosis Foundation, 2011). As fracturas por fragilidade são o resultado final da doença e representam a principal causa de morbilidade e mortalidade (Marini & Brandi, 2010; Prentice, 2004; Rachner *et al*, 2011; Stolk *et al*, 2007)

As fracturas mais comuns localizam-se no pulso, coluna vertebral e anca embora possam ocorrer em todo o esqueleto. A incidência de fracturas vertebrais e da anca aumenta exponencialmente com a idade, enquanto os níveis de fracturas no pulso diminuem após a idade de 60 anos (International Osteoporosis Foundation, 2011; Prentice, 2004; Rachner *et al*, 2011).



Tradicionalmente, esta situação tem sido considerada em mulheres na pós-menopausa mas a osteoporose em homens é hoje reconhecida como um problema de saúde pública cada vez mais importante (Lorentzon *et al*, 2004). Vinte a vinte cinco por cento de todas as fracturas da anca ocorrem em homens e as deformidades vertebrais parecem afectar homens e mulheres na mesma proporção (Koh *et al*, 2006; Lorentzon *et al*, 2004).

Com o constante envelhecimento das populações, em países desenvolvidos mas também na América do Sul, Ásia e África, a osteoporose está a tornar-se, cada vez mais, num grande problema de saúde pública mundial (Marini & Brandi, 2010; Meier & Kraenzlin, 2011)

Hoje, mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo e 30% das mulheres num estadio de pós-menopausa nos Estados Unidos da América e Europa são afectadas por esta doença (Gjesdal *et al*, 2006). Pelo menos 40% de todas as mulheres afectadas e 15-30% de todos os homens afectados irão sofrer uma fractura por fragilidade durante as suas vidas (International Osteoporosis Foundation, 2011; Marini & Brandi, 2010; Rachner *et al*, 2011).

A identificação dos factores responsáveis para a predisposição e desenvolvimento de osteoporose é fundamental para a prevenção da doença e para encontrar novas terapias (Marini & Brandi, 2010).

De acordo com a Fundação Internacional de Osteoporose (IOF), os factores de risco para a osteoporose podem-se dividir em duas classes principais: os riscos modificáveis, que dependem principalmente do estilo de vida e dos hábitos nutricionais que podem ser modificados; e os riscos fixos, que são inatos e não podem ser modificados, como por exemplo a idade, o género, predisposição genética, a existência de fracturas prévias, entre outros (International Osteoporosis Foundation, 2011; Marini & Brandi, 2010).

Está então acordado na Comunidade Científica, que a osteoporose é uma doença multifactorial complexa causada pela interacção de factores ambientais e factores genéticos que provocam um efeito singular no metabolismo ósseo e no risco de fracturas. (Marini & Brandi, 2010; Migliaccio *et al*, 2011)

Estudos realizados demonstraram que os factores genéticos são responsáveis por 60-85% da variabilidade interindividual da densidade mineral óssea (BMD) e este efeito parece persistir até nas décadas de vida mais avançadas (Liu *et al*, 2009; Marini & Brandi, 2010).

A hereditariedade da densidade mineral óssea (BMD) varia entre diferentes locais do esqueleto. O risco de fracturas por fragilidade também parece ter uma componente genética (Marini & Brandi, 2010). De modo interessante, o risco de fracturas com história familiar tem mostrado ser independente da BMD e talvez influenciada por outros factores, tais como a geometria do osso ou o risco de quedas (Liu et al, 2009; Marini & Brandi, 2010). No entanto, a influência da hereditariedade das fracturas parece diminuir com a idade, devido talvez ao facto dos factores ambientais se tornarem cada vez mais importantes. Outras propriedades do osso, tais como as propriedades quantitativas por ultra-sons e a geometria da base do fémur têm demonstrado estar sob o controlo de factores genéticos (Marini & Brandi, 2010).

A osteoporose relacionada com a idade é uma doença multifactorial heterogénea e até à data, as suas bases genéticas exactas são desconhecidas. De facto, o metabolismo ósseo é regulado por diversos genes. Alguns têm um grau elevado de influência (*genes major*) e outros, ainda mais numerosos, possuem efeitos menores (*genes minor*) (Liu et al, 2009; Marini & Brandi, 2010).

Devido à complexa biologia do esqueleto, os genes candidatos da osteoporose são numerosos e o número de genes identificados que estão envolvidos no metabolismo ósseo está constantemente a aumentar. Estes incluem genes envolvidos na regulação do metabolismo ósseo e do cálcio, tais como os que codificam para as hormonas sexuais e calciotróficas e os seus receptores, para proteínas da matriz óssea, citocinas, factores de crescimento e mediadores locais e os seus receptores e para proteínas envolvidas em precursores moleculares de células ósseas (Marini & Brandi, 2010).

Durante vários anos, a osteoporose e as doenças cardiovasculares (CVDs) têm sido consideradas como duas consequências independentes do envelhecimento. No entanto, evidências recentes suportam uma associação entre estas duas doenças, indicando mecanismos fisiopatológicos comuns e, talvez, bases genéticas (Marini & Brandi, 2010; Meier & Kraenzlin, 2011).

## **1.2 Osteoporose e a Doença Cardiovascular**

Alguns estudos têm reportado associações entre doenças cardiovasculares (CVDs) relacionadas com a idade e perda de massa óssea e indicam etiologias comuns para as doenças cardiovasculares e as fracturas osteoporóticas com um risco

substancialmente elevado de fracturas da anca em mulheres após o diagnóstico de uma CVD (Marini & Brandi, 2010).

Mais de 90% das placas de aterosclerose sofrem calcificações. Agora, sabe-se bem que o metabolismo do cálcio tem um papel central na mineralização do osso e no risco do desenvolvimento e progressão de arteriosclerose, já que os factores reguladores da função das células ósseas podem também afectar a calcificação vascular (Marini & Brandi, 2010; Osako *et al*, 2010).

Outros factores biológicos e ambientais parecem estar envolvidos na alteração da mineralização óssea e nas calcificações vasculares, tais como a insuficiência em vitamina D, baixo consumo de cálcio, deficiência de estrogénios, processos inflamatórios crónicos, stresse oxidativo, dislipidémia, dietas com alto teor de gordura, hábitos tabágicos, actividade física baixa (Marini & Brandi, 2010; Migliaccio *et al*, 2011).

Pessoas idosas com deficiências de cálcio e vitamina D podem contribuir para a mobilização de cálcio dos ossos com um consequente risco acrescido de fracturas e de calcificação severa de veias e artérias (Marini & Brandi, 2010).

Ao mesmo tempo, a deficiência de estrogénios relacionada com a idade, pode induzir o aumento de citocinas pro-inflamatórias (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) que aumenta a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, favorecendo a progressão de placas ateroscleróticas. A deficiência de estrogénios também induz a diminuição de OPG (osteoprotegerina) com a consequente mobilização de cálcio dos ossos e o risco de calcificação das placas ateroscleróticas. Por último, a deficiência de estrogénios induz uma redução na produção de óxido nítrico, que tem efeitos atero-protectores mas também tem um papel na função dos osteoblastos e regula a função endotelial da microcirculação óssea (Marini & Brandi, 2010; Osako *et al*, 2010).

Por outro lado, um colesterol das LDL elevado e das HDL baixo, suspeita-se ser responsável pela aterosclerose e está associado também com uma baixa densidade mineral óssea e com fracturas das vértebras em mulheres em pós-menopausa (Marini & Brandi, 2010).

A alteração do mecanismo dos lípidos está associada com a remodelação óssea e com o processo de aterosclerose e isto pode explicar, em parte, a coexistência de aterosclerose e osteoporose em pacientes com dislipidémia (Marini & Brandi, 2010; Osako *et al*, 2010).

Estudos animais, clínicos e epidemiológicos sugerem que a pressão arterial elevada está associada com irregularidades no metabolismo do cálcio, levando a um aumento da perda de cálcio, aumento do movimento de cálcio do osso e risco a longo prazo de desmineralização do osso e osteoporose. Estudos transversais em humanos têm mostrado uma associação positiva inversa entre pressão arterial e densidade mineral óssea, o que suporta uma possível correlação entre hipertensão e osteoporose (Marini & Brandi, 2010).

A osteoporose ocorre numa variedade de condições clínicas associadas ao excesso de ferro tais como a hemocromatose e doenças no fígado, o que sugere que este mecanismo comum causa a perda de massa óssea (He *et al*, 2013; Li *et al*, 20112).

O ferro é um nutriente essencial, com funções biológicas importantes, incluindo o seu papel fundamental na hemoglobina, stresse oxidante e na resposta imunitária. No entanto, uma concentração elevada de ferro é prejudicial para as células e tecidos. Quando a capacidade de ligação da transferrina é diminuída por uma concentração elevada de ferro na circulação e nos tecidos, o ferro livre deposita-se nos tecidos e cria uma condição patológica denominada sobrecarga/excesso de ferro (He *et al*, 2013; Li *et al*, 20112).

Esta condição foi originalmente associada principalmente a doenças do sistema cardiovascular e do cérebro (Li *et al*, 20112). Estudos recentes têm demonstrado que a sobrecarga de ferro está também envolvida no metabolismo do osso mas o seu efeito nos osteoblastos não está totalmente esclarecido. De acordo com o estudo de He *et al* (2013), parece que a sobrecarga de ferro inibe provavelmente a função dos osteoblastos através de um stresse oxidativo mais elevado, seguido de concentrações de ferro intracelular aumentadas.

### **1.3 Osteoporose e Obesidade**

A obesidade e a osteoporose são dois problemas importantes de saúde global, com uma prevalência crescente e impacto elevado na mortalidade e morbilidade. Nas últimas décadas, estas doenças tornaram-se numa grande ameaça à saúde mundial. (Guo *et al*, 2011; Migliaccio *et al*, 2011)

A idade e o sexo feminino aumentam o risco de desenvolver obesidade e osteoporose, afectando milhões de mulheres. Mudanças relacionadas com a idade na composição corporal, factores metabólicos e os níveis hormonais após a menopausa, acompanhado por uma diminuição da actividade física, podem fornecer todos os mecanismos para a propensão de aumento de peso e, em particular, para o aumento da massa gorda, muitas vezes caracterizada pela substituição de massa magra pelo tecido adiposo. (Migliaccio *et al*, 2011)

A obesidade dá-se devido a um desequilíbrio em que a ingestão de energia excede o dispêndio de energia ao longo de um período prolongado. Em adultos saudáveis, o peso corporal é altamente regulado, apesar das variações do dia-a-dia, pela ingestão de alimentos e gasto de energia. Vários factores ambientais, nutricionais e hormonais parecem influenciar o peso corporal. (Migliaccio *et al*, 2011)

Um exemplo são as mulheres em pós-menopausa, que muitas vezes aumentam o peso corporal, provavelmente devido a uma diminuição no metabolismo basal, alteração dos níveis hormonais e actividade física reduzida. Além disso, as mulheres obesas na pós-menopausa são frequentemente afectadas por hipertensão arterial, dislipidémia, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, e têm um risco acrescido de desenvolver alguns tipos de cancro. Curiosamente, estas mulheres foram sempre consideradas protegidas da osteoporose. (Bredella *et al*, 2011; Migliaccio *et al*, 2011)

Numerosos estudos epidemiológicos mostram que um elevado peso corporal ou índice de massa corporal (IMC), estão relacionados com uma massa óssea elevada e que a diminuição do peso pode provocar perda de massa óssea. Os mecanismos hipotéticos para estas observações são: em primeiro lugar, é geralmente aceite que uma maior massa corporal resulta numa carga mecânica mais pesada do osso, aumentando a diferenciação dos osteoblastos. O aumento de peso no período pós-menopausa resulta num aumento do número de adipócitos, que são importantes fontes de estrogénio derivados de aromatização, resultando no aumento da densidade mineral óssea (BMD) em mulheres pós-menopáusicas. Além disso, a resistência à insulina de células adiposas pode aumentar as quantidades de hormonas sexuais em circulação, tais como androgénios e estrogénios, aumentando a massa óssea. (Kim *et al*, 2010)

A osteoporose, como já foi dito, é uma doença óssea metabólica caracterizada por uma fragilidade esquelética excessiva (devido a uma redução tanto na quantidade

como na qualidade óssea), levando a um aumento no risco de desenvolvimento de fracturas ósseas espontâneas e traumáticas. Em média, mais de 40% das mulheres na pós-menopausa irá sofrer pelo menos uma fractura osteoporótica, muitas vezes levando a uma incapacidade grave e permanente e até mesmo à morte. (Migliaccio *et al*, 2011)

A relação entre a deficiência de estrogénios e o declínio da massa óssea é bem estabelecida. Em mulheres na perimenopausa, a perda óssea fisiológica é acelerada e estimada em 2% por ano. Este processo inicia-se cerca de 1.5 anos antes da menopausa e, durante os 8 anos seguintes, a taxa de perda óssea é superior a 10.5% (Holecki *et al*, 2012).

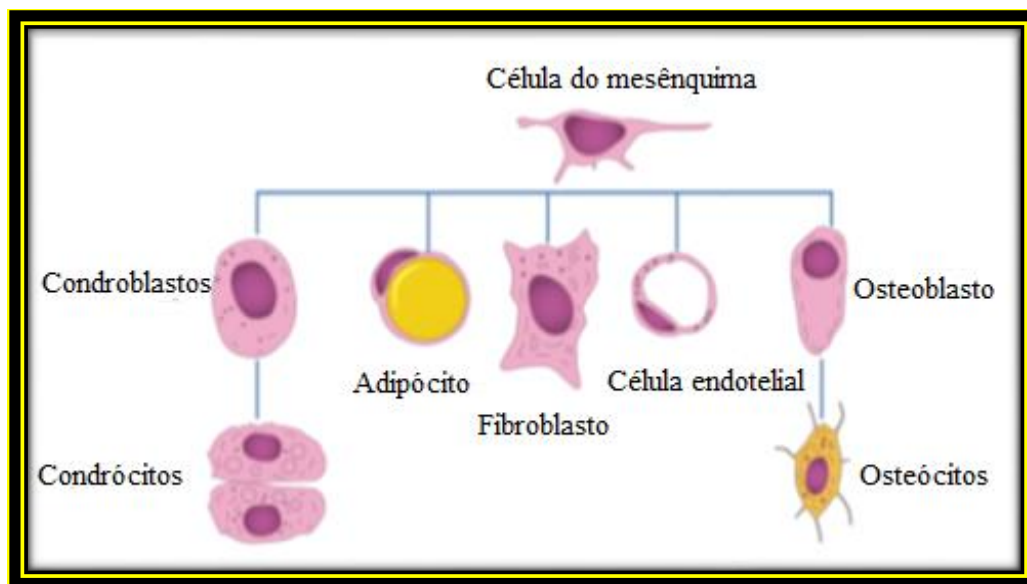
A taxa de perda de massa óssea em adultos reflecte a interacção entre factores genéticos e ambientais, o que também influencia o grau de aquisição de osso durante o crescimento, conhecido como pico de massa óssea. (Cha *et al*, 2012; Migliaccio *et al*, 2011)

A massa gorda e a massa magra estão correlacionadas com a densidade mineral óssea, com a protecção que a obesidade aparentemente confere contra a perda óssea após a menopausa. O papel fisiopatológico do tecido adiposo na homeostase esquelética reside, provavelmente, no papel que várias adipocinas desempenham na remodelação óssea, através dos seus efeitos na formação ou reabsorção ósseas. (Bredella *et al*, 2011; Migliaccio *et al*, 2011)

Uma vez demonstrada que as células ósseas expressam vários receptores hormonais específicos, o esqueleto tem vindo a ser considerado como um órgão-alvo endócrino. Além disso, observações recentes têm mostrado que factores derivados do osso, tais como a osteocalcina e a osteopontina, podem afectar o controlo do peso corporal e da homeostase da glicose, sugerindo um possível papel do tecido ósseo como um órgão endócrino com a presença de um potencial mecanismo de feedback entre o esqueleto e os órgãos endócrinos. (Migliaccio *et al*, 2011)

Assim, a relação entre gordura e os ossos constitui possivelmente um sistema de retrocontrolo homeostático em que as adipocinas e as moléculas secretadas pelos osteoblastos e osteoclastos representam a ligação de um eixo activo osso-tecido adiposo. No entanto, os mecanismos pelos quais todos estes eventos ocorrem permanecem incompreendidos. (Migliaccio *et al*, 2011)

Nas últimas três décadas, a associação inversa entre obesidade e osteoporose tem sido activamente investigada do ponto de vista epidemiológico, clínico e de pesquisa comum e têm sido propostas ligações fisiopatológicas comuns tais como: a obesidade e a osteoporose são influenciadas por factores genéticos e ambientais ou a interacção entre eles; o envelhecimento está associado a ambas as doenças e com uma elevada incidência de perda de massa óssea e adiposidade da medula óssea; a remodelação óssea e adiposidade são reguladas por meio de uma interacção complexa de adipocinas e hormonas, e os adipócitos e os osteoblastos derivam de um antepassado comum, isto é, as células estaminais do mesênquima (Figura 2). (Guo *et al*, 2011; Migliaccio *et al*, 2011)



**Figura 2** – Linhas celulares que derivam de uma célula estaminal do mesênquima. (adaptado de Migliaccio *et al*, 2011)

Inúmeros dados mostram que, em mulheres saudáveis em pré e pós-menopausa, a massa gorda total está positivamente relacionada com a densidade mineral óssea, um determinante importante e mensurável de risco de fractura e que o peso corporal elevado (índice de massa corporal) está correlacionado com a densidade mineral óssea elevada e que a diminuição do peso corporal leva à perda de massa óssea. Além disso, a massa gorda, sendo o índice de obesidade mais importante, foi demonstrado ter um efeito benéfico semelhante, levando a um aumento na massa óssea, enquanto o efeito benéfico da massa gorda sobre a densidade mineral do osso é confirmada em mulheres caucasianas, mas não em homens caucasianos. (Bredella *et al*, 2011; Migliaccio *et al*, 2011)

Ainda que estes dados indiquem que a obesidade exerce um efeito protector no tecido ósseo, estudos mais recentes têm descrito o oposto. Em particular, estudos transversais e longitudinais mostram que a massa óssea está positivamente relacionada com o peso corporal e índice de massa corporal, mas existem questões controversas sobre se a massa magra ou massa gorda podem ser o determinante mais importante da densidade mineral óssea. Em particular, as evidências sugerem uma relação inversa entre a obesidade e osteoporose, dependendo de como a obesidade é definida. (Bredella *et al*, 2011; Kim *et al*, 2010; Migliaccio *et al*, 2011)

Existem dados que indicam que mulheres com um elevado índice de massa corporal (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) são protegidas contra a osteoporose, mas há evidências crescentes que entram em conflito com esta observação, sugerindo que a obesidade (índice de massa corporal > 30) pode realmente interferir na saúde do osso. (Cha *et al*, 2012; Migliaccio *et al*, 2011)

#### **1.4 Diagnóstico e Factores de risco**

O diagnóstico clínico da osteoporose pode ser baseado em resultados da medição da BMD através da densitometria óssea de energia dupla (DXA) (Honig & Chang, 2012; Manolagas *et al*, 2002). Em homens e mulheres em pós-menopausa com mais de 50 anos, o BMD é classificado de acordo com o T-score. O T-score é o número de desvios padrão acima ou abaixo da média para adultos saudáveis de 20 a 29 anos de idade, determinado pelo DXA. A osteoporose é definida com um T-score de -2.5 ou menos. Um T-score entre -2.5 e -1.0 é definido como baixa densidade óssea. Um T-score de -1 ou maior é considerado normal. A densidade óssea pode também ser classificada de acordo com o Z-score, número de desvios padrão acima ou abaixo do BMD expectável para os pacientes de acordo com a idade e o sexo. Um Z-score de -2.0 ou menos é definido como tendo “baixo BMD para a idade cronológica” ou “abaixo do limite esperado para a idade”, e aqueles acima de -2.0 estão “dentro do limite esperado para a idade”. (Crandall *et al*, 2012; Honig & Chang, 2012; Rachner *et al*, 2011).

Indivíduos que já tenham tido uma fractura traumática mínima estão num risco acrescido de uma futura fractura osteoporótica, independente do BMD. Como a maioria das fracturas ocorrem em pacientes com densidade óssea baixa em vez de osteoporose,



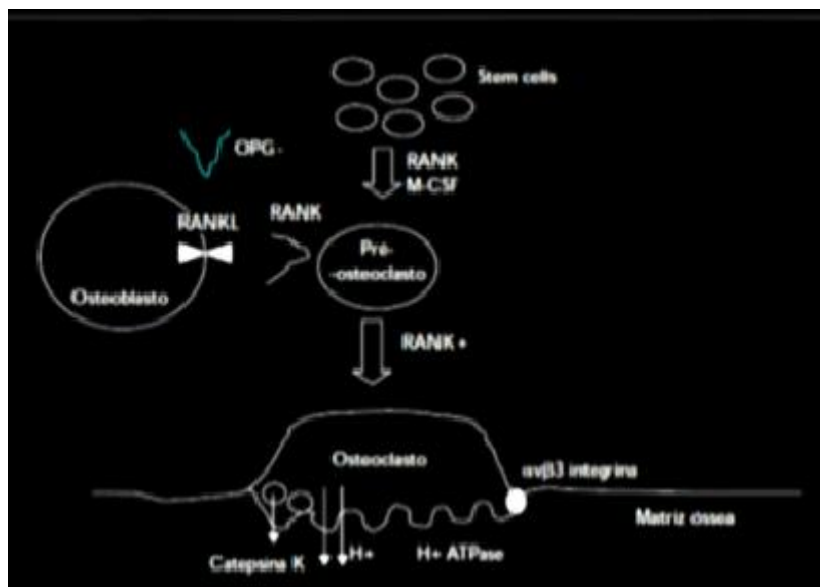
os valores de risco que combinam os factores de risco com os resultados da BMD, tais como a FRAX® (World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool), têm sido recentemente desenvolvidos para melhorar a capacidade de predizer riscos de fractura entre pessoas com densidade óssea baixa. (Crandall *et al*, 2012; Herrera *et al*, 2012; Rachner *et al*, 2011)

Os factores de risco para fractura osteoporótica incluem o aumento da idade, o sexo feminino, hipogonadismo ou falência dos ovários, baixo peso, história familiar de fractura da anca, etnia, tabagismo, consumo de álcool, BMD baixo, deficiência de vitamina D, baixo consumo de cálcio, entre outros. (Crandall *et al*, 2012; Herrera *et al*, 2012)

### **1.5 Fisiopatologia da perda óssea**

A remodelação óssea é necessária para a homeostase saudável do cálcio e para a reparação de danos ocorridos com o stress e idade. Os osteoclastos reabsorvem osso e os osteoblastos formam osso. Estes processos ocorrem normalmente numa sequência de acontecimentos bem regulada, onde a quantidade de osso formada iguala a quantidade de osso reabsorvido, restaurando completamente o osso removido. Os osteócitos são o terceiro tipo de célula que desempenha um papel essencial na remodelação óssea. Eles parecem regular a activação da remodelação óssea e exercem tanto uma regulação positiva como uma regulação negativa nos osteoclastos e osteoblastos (Henriksen *et al*, 2009).

Os osteoclastos são originários das células estaminais hematopoiéticas e estão intimamente relacionadas com os monócitos e os macrófagos. A diferenciação de células precursoras de osteoclastos para osteoclastos multinucleados totalmente activados depende criticamente da presença do receptor activador do ligando de NF- $\kappa$ B (RANKL), um membro da família das TNF, bem como o papel permissivo do factor de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF) (figura 3). (Matsuo & Irie, 2008; Rachner *et al*, 2011).



**Figura 3** – Mecanismos reguladores da diferenciação e actividade dos osteoclastos. (Canhão *et al*, 2005)

A reabsorção óssea dá-se pela acção de osteoclastos, que reabsorvem a matriz óssea através da secreção de ácido clorídrico, que dissolve fosfato de cálcio e de enzimas como as collagenases e outras proteases. Após a acção dos osteoclastos no local de reabsorção óssea, os osteoblastos sintetizam osso novo (Manolagas *et al*, 2002). O componente orgânico da matriz óssea consiste principalmente em fibras de colagénio tipo I, produzidas pelos osteoblastos. A osteonectina, sialoproteínas e osteocalcina são as principais proteínas segregadas pelos osteoblastos e incorporadas na matriz óssea. Seguem-se duas fases de mineralização mediadas pelos osteoblastos, sendo que, no primeiro, ocorre a deposição de cristais de hidroxiapatite entre as fibrilhas de colagénio. Nesse processo de mineralização, a fosfatase alcalina localizada na membrana do osteoblasto desempenha um papel muito importante. No segundo estadio, a deposição adicional de minerais ocorre no local de reabsorção óssea (Khajuria *et al*, 2011, Matsuo & Irie, 2008; Rachner *et al*, 2011).

O estrogénio é outra hormona sistémica que tem efeitos directos no osso e desempenha um papel importante na osteoporose. Após a menopausa, a deficiência de estrogénio leva a uma regulação positiva de RANKL nas células da medula óssea, que é um importante determinante do aumento de reabsorção óssea, enquanto o próprio estrogénio estimula a produção de osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos exercendo, em consequência, efeitos anti-reabsortivos no osso. Os efeitos extra-esqueléticos da

deficiência de estrogénio baseiam-se principalmente no aumento da excreção renal de cálcio e na redução da absorção intestinal deste mineral. A deficiência de estrogénio causa também um aumento contínuo nos níveis de PTH (Khajuria *et al*, 2011; Manolagas *et al*, 2002; Matsuo & Irie, 2008; Rachner *et al*, 2011).

## 1.6 Terapêutica

É recomendada terapia para mulheres em pós-menopausa e homens com 50 ou mais anos que apresentem: fractura da anca ou vértebra (clínica ou morfométrica); T-score  $\leq -2.5$  no colo do fémur ou coluna após uma avaliação adequada para excluir causas secundárias; densidade óssea baixa (T-score entre -1.0 e -2.5 o colo do fémur ou coluna) e uma probabilidade de fractura da anca em 10 anos  $\geq 3\%$  ou uma probabilidade em 10 anos de uma grande fractura relacionada com a osteoporose  $\geq 20\%$  baseado no algoritmo adaptado da WHO. O aumento da prevalência e custo da osteoporose aumentaram o interesse na eficácia e segurança das intervenções actualmente disponíveis para prevenir fracturas osteoporóticas. Estas intervenções incluem agentes farmacológicos, um agente biológico, dieta e suplementos de vitamina D e cálcio, e exercícios de sustentação de peso. (Crandall *et al*, 2012; Herrera *et al*, 2012)

Os agentes farmacológicos incluem drogas da classe dos bisfosfonatos, hormonas peptídicas (hormona paratiróide e a calcitonina), estrogénio (sob a forma de terapia de reposição hormonal) para mulheres na pós-menopausa e moduladores selectivos do receptor de estrogénio (*Raloxifene* para mulheres na pós-menopausa). Com a excepção da hormona paratiróide, cada um destes agentes actua para prevenir a reabsorção óssea. Os bisfosfonatos são compostos que se ligam reversivelmente às superfícies do osso mineralizado e interrompem a reabsorção pelos osteoclastos. (Crandall *et al*, 2012; Herrera *et al*, 2012; Honig & Chang, 2012; Rachner *et al*, 2011)

Um novo agente terapêutico, *Denosumab*, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em Junho de 2010. O *Denosumab* é um anticorpo monoclonal que inibe o Receptor Activador do Factor Nuclear do ligando Kappa-B (RANKL), um estimulador da diferenciação e activação de osteoclastos. Inibindo a formação de osteoclastos, sobrevivência e função, o *Denosumab* diminui a reabsorção óssea. (Crandall *et al*, 2012; Rachner *et al*, 2011).

Além dos agentes farmacológicos, o cálcio e a vitamina D, bem como os exercícios de sustentação de peso, desempenham papéis importantes na preservação da massa óssea. O consumo de cálcio ao longo da vida é necessária para a aquisição de um bom pico de massa óssea e para a subsequente manutenção da saúde dos ossos. Quando os níveis de cálcio sérico são inadequados, o tecido ósseo é reabsorvido do esqueleto para manter o cálcio sérico a um nível constante. Níveis adequados de vitamina D desempenham um papel fundamental na absorção de cálcio, saúde óssea, desempenho muscular, equilíbrio e prevenção de quedas. (Crandall *et al*, 2012; Herrera *et al*, 2012)

Os vários agentes utilizados para prevenir e tratar a osteoporose têm sido associados com uma variedade de efeitos adversos, dos mais comuns, efeitos ligeiros (como pequenas queixas gastrointestinais) para problemas potencialmente sérios. Algumas evidências sugerem que estas queixas menores, juntamente com preocupações sobre efeitos mais graves, pode afectar o nível de cumprimento e persistência do tratamento. A baixa adesão e persistência podem, por sua vez, afectar a eficácia dos tratamentos. (Crandall *et al*, 2012; Rachner *et al*, 2011)

## **1.7 Polimorfismos genéticos em estudo**

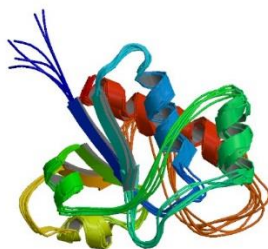
### **1.7.1 ACP1 – Fosfatase Ácida do eritrócito ou Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP)**

As células respondem a estímulos internos e externos, através de redes integradas de vias de sinalização que envolvem cascatas sequenciais de fosforilação ou desfosforilação mediadas pela acção de proteínas cinases e proteínas fosfatases. Especificamente, a fosforilação de tirosina é geralmente aceite como um regulador crítico de uma variedade de processos celulares biológicos, incluindo a proliferação celular, migração, diferenciação e sobrevivência (Zambuzzi *et al*, 2008).

Das várias proteínas tirosinas cinases que se conhecem, a Src cinase tem um papel importante em processos fisiológicos e patológicos tais como sobrevivência celular, diferenciação, formação de tumores e inflamação. A actividade da Src cinase é também importante na homeostase do osso e foi demonstrada a importância da ACP1 no metabolismo ósseo na medida em que modula a actividade da Src cinase durante a diferenciação dos osteoblastos. A subexpressão da fosfatase ácida aumenta a actividade

da Src cinase levando a uma diminuição da diferenciação osteoblástica e, consequentemente, a um desequilíbrio nos mecanismos de remodelação óssea (Martins *et al*, 2008; Zambuzzi *et al*, 2008).

A proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (E.C.3.1.3.48) (cLMWPTPase) ou fosfatase ácida do *locus* 1 (ACP1) (figura 4) é uma enzima de 18 KDa, altamente polimórfica e que está envolvida em diversas vias de transdução de sinal (Chiarugi *et al*, 2002; Martins *et al*, 2008).



**Figura 4** - Estrutura tridimensional da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (ACP1). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/?term=acp1>)

A LMW-PTP, codificada pelo gene ACP1, está presente em todos os tecidos humanos sob a forma de duas proteínas ou isoenzimas designadas por ACP1 – *f* e *s* (*fast* e *slow*). Estas enzimas são idênticas, com a exceção de 33 aminoácidos que são resultado de um processamento (*splicing*) alternativo no terceiro e quarto exões, respectivamente, sendo reconhecidas laboratorialmente através da sua mobilidade diferencial em electroforese em gel de amido (Martins *et al*, 2008; Wilder & Hammer, 2004).

Alterações na quantidade de isoenzimas *f* e *s* produzidos por cada alelo têm sido associados a mutações que interrompem potenciadores de *splicing* exónicos (Wilder & Hammer, 2004).

É controlada por um *locus* autossómico localizado no braço curto do cromossoma 2 (2p25) com três alelos codominantes mais comuns (A, B e C). Na população caucasiana existem 6 fenótipos proteicos correspondentes a outros tantos genótipos que apresentam importantes variações na actividade enzimática total e na razão entre as concentrações das duas isoenzimas (Martins *et al*, 2008; Wilder & Hammer, 2004).



**Figura 5** - Organização do gene ACP1. Os exões estão representados pelas barras a laranja. Os exões que dão origem à isoenzima *f* e *s* estão indicados em A e B, respectivamente, e a região 3' não traduzida está representada pelo rectângulo. (adaptado de Martins *et al*, 2008)

A ACP1 pode apresentar variações na sua actividade que estão dependentes do seu genótipo, da sua actividade de fosfotransferase e da modulação por folatos e purinas. Estas actividades variam de genótipo para genótipo sendo cerca de 60% desta variabilidade devida ao polimorfismo electroforético. O alelo A está associado à actividade enzimática mais baixa, o alelo B à actividade intermédia e o alelo C à mais elevada (Martins *et al*, 2008).

Estudos anteriores demonstraram uma associação entre o polimorfismo C677T do MTHFR e a actividade da ACP1 na medida em que esta última activa a degradação de FAD, cofactor do MTHFR (Zambuzzi *et al*, 2008).

### 1.7.2 MTHFR - Metilenotetrahidrofolato Redutase

Em 1932, Burtz e du Vigneaud descobriram na Universidade de Illinois (E.U.A) um novo aminoácido através do tratamento da metionina com ácido sulfúrico. A semelhança na estrutura deste aminoácido com a cisteína e o facto de conter um átomo de carbono extra, foi denominada como homocisteína (Yilmaz, 2012). Du Vigneaud investigou o papel da homocisteína no metabolismo e a sua capacidade de substituir a metionina como um nutriente essencial para o crescimento de animais. Pouco mais foi descoberto acerca da importância da homocisteína na medicina ou nas doenças vasculares nos anos 50 (Yilmaz, 2012).

Mais tarde, este aminoácido tornou-se famoso. O nome homocisteína (Hcy) é específico para aminoácidos que contêm tiol. No entanto, os tecidos e especialmente o

plasma contêm persulfuretos relacionados que são normalmente medidos juntos com a homocisteína. (Yilmaz, 2012)

De acordo com os conceitos correntes, a homocisteína danifica células e tecidos de artérias, incitando a libertação de citocinas, ciclinas e outros mediadores de inflamação e divisão celular. Apesar da Hcy ser um metabolito normal, o seu excesso pode ser extremamente tóxico para humanos, animais, leveduras e células bacterianas. (Yilmaz, 2012)

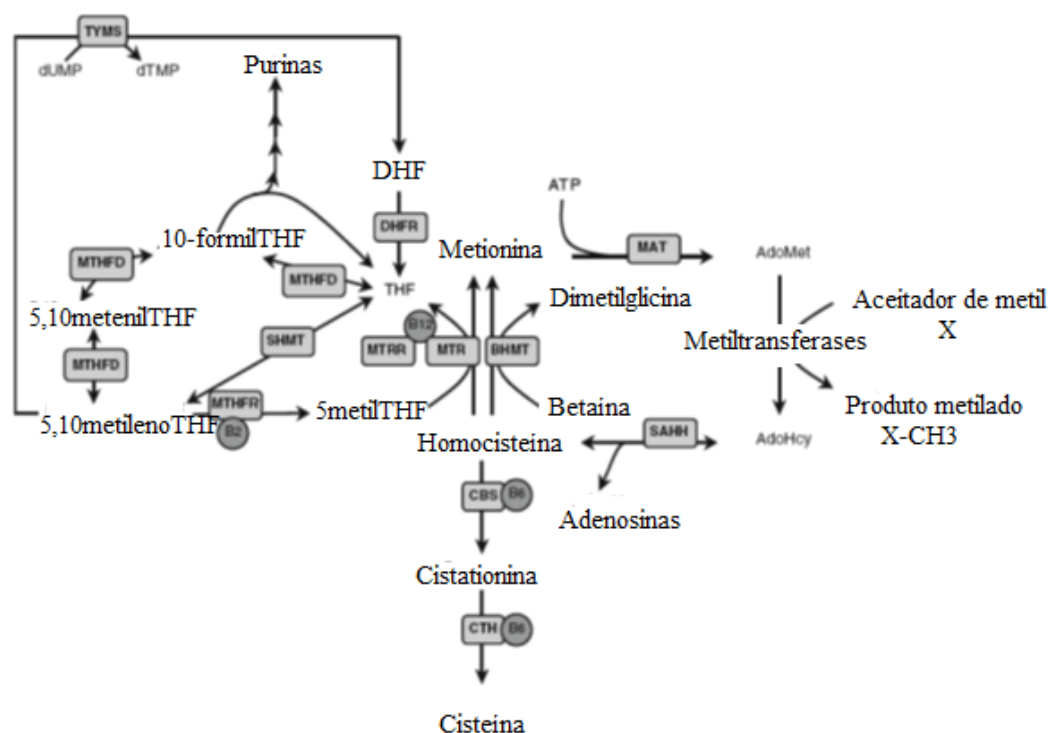
Este aminoácido é aceite como um factor de risco independente para várias patologias graves, incluindo a doença cardiovascular, defeitos no nascimento, osteoporose, doença de Alzheimer e insuficiência renal. Muitas destas patologias associadas com a homocisteína estão também ligadas ao stresse oxidativo. Espécies reactivas de oxigénio (ROS) podem, por sua vez, elevar a tensão do stresse redox e causar lesões às células. O stresse oxidativo está também ligado a diminuições nas funções pulmonares, cerebrais, circulatórias e reprodutivas. (Yilmaz, 2012)

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfuroso que funciona como um intermediário chave no metabolismo da metionina (Koh *et al*, 2009) e tem mostrado ser um importante pro-oxidante *in vivo* e *in vitro*. Sabe-se, através de estudos, que a homocisteína regula a formação e a actividade dos osteoclastos através do aumento da geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e que níveis elevados de homocisteína resultam num aumento da reabsorção óssea. (Koh *et al*, 2009)

A ligação entre a homocisteína e a osteoporose foi demonstrada pela homocistinúria hereditária que é uma doença genética rara caracterizada por hiper-homocistinémia grave (níveis elevados de homocisteína no sangue) e aparecimento precoce de aterosclerose e osteoporose. (Hong *et al*, 2007; Koh *et al*, 2009)

Curiosamente, a hiper-homocistinémia leve a moderada é bastante comum em pessoas idosas e tem mostrado estar associado com uma massa óssea diminuída e um maior risco de fracturas. Estes níveis elevados de homocisteína no sangue parecem estar também associados a outras doenças como a doença cardiovascular e doença de Alzheimer (Brustolin *et al*, 2010; Koh *et al*, 2009; Semmler *et al*, 2011).

O enzima monomérico 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a redução de 5,10 metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). O 5-MTHF é um dador de grupos metil para a remetilação de homocisteína em metionina (figura 6) (Blom & Smulders, 2011; Semmler *et al*, 2011).



**Figura 6** – Representação esquemática dos ciclos do folato e metabolismo da homocisteína.  
(adaptado de Blom & Smulders, 2011)

O gene MTHFR tem pelo menos dois polimorfismos funcionais, C677T e A1298C. O alelo MTHFR 677T está associado com uma actividade enzimática reduzida, diminuição das concentrações de folato no soro, plasma e glóbulos vermelhos e concentrações ligeiramente elevadas de homocisteína total no plasma (tHcy) (Brustolin *et al*, 2010). O nível de Hcy plasmática é um fenótipo quantitativo que é influenciado por factores genéticos e ambientais (sexo, idade, função renal e ingestão de vitaminas) (Souto *et al*, 2005).

O polimorfismo em questão parece estar associado com a osteoporose e com o aumento do risco de fracturas (Hong *et al*, 2007; Koh *et al*, 2009) e tem sido estudado extensivamente em relação a estas doenças, pois o genótipo TT homozigótico está associado com uma actividade enzimática reduzida e níveis mais elevados de homocisteína em comparação com o genótipo CC mais comum (Brustolin *et al*, 2010). Estes níveis elevados de homocisteína, pensa-se que interferem com a formação de ligações cruzadas de colagénio, resultando numa má qualidade do osso e maior susceptibilidade para fracturas (Koh *et al*, 2009). A frequência deste alelo difere entre grupos étnicos e varia de 6-10% em países Africanos, em mais de 17% em caucasianos da América do Norte e mais de 50% nas populações do México (Semmler *et al*, 2011).

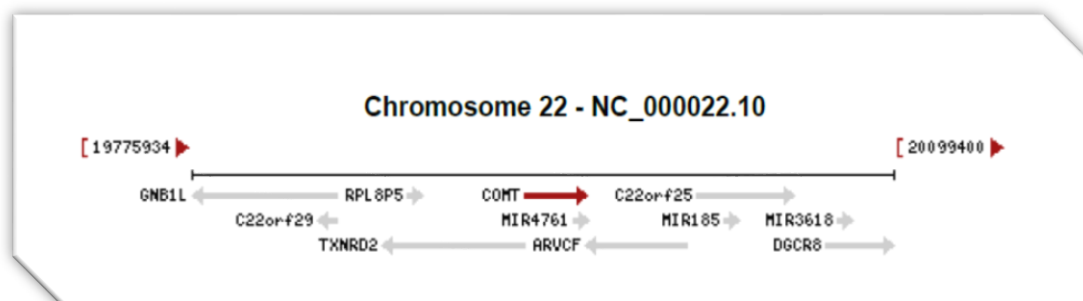


### 1.7.3 COMT - Catecol-O-metiltransferase

Os esteróides sexuais desempenham um papel importante no desenvolvimento ósseo. Logo, os genes que regulam a produção e o metabolismo de esteróides sexuais são bons candidatos para estudar o seu envolvimento no desenvolvimento da osteoporose (Stolk *et al*, 2007). Dada a importância reconhecida, é razoável procurar genes candidatos dentro deste sistema (Lorentzon *et al*, 2004).

A catecol-O-metiltransferase (COMT) é uma enzima de fase II importante envolvida na conjugação e inativação de estrogénios e catecolaminas, tais como a noradrenalina, adrenalina e dopamina, através da transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) (Ko *et al*, 2012). A COMT é expressa em níveis elevados numa variedade de tecidos humanos, incluindo o fígado, rim, mama e glóbulos vermelhos do sangue. (Qin *et al*, 2012)

O gene da COMT está localizado no cromossoma 22q11 e contém um polimorfismo de um único nucleótido (SNP) (rs4680G/A) no quarto exão (figura 7). (Ko *et al*, 2012; Qin *et al*, 2012)



**Figura 7** – Localização do gene que codifica a catecol-O-metiltransferase. (in

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>)

No gene que codifica para a enzima que degrada estrogénios, a catecol-O-metiltransferase (COMT), há um polimorfismo funcional G→A que resulta numa substituição de valina por metionina no codão 158 (Gao *et al*, 2009; Lorentzon *et al*, 2004; Stolk *et al*, 2007). Esta substituição de aminoácidos leva a uma diferença de 60-75% na actividade enzimática entre as variantes *Valina* (actividade elevada) e *Metionina* (actividade reduzida) (Lorentzon *et al*, 2007; Qin *et al*, 2012).

Os alelos são, portanto, conhecidos como alelos de actividade reduzida (COMT<sup>L</sup>) e alelos de actividade elevada (COMT<sup>H</sup>) e estas variantes alélicas só afectam a actividade da enzima (Gao *et al*, 2009). A frequência da variante metionina é de cerca de 50% em populações caucasianas (Stolk *et al*, 2007).

Sabe-se também que a COMT auxilia a catálise da síntese de homocisteína, o que permite às células metilar compostos constituintes como o DNA, lípidos, proteínas e neurotransmissores (Ko *et al*, 2012).

Em homens de meia-idade, o alelo de actividade reduzida mostrou estar associado ao aumento de níveis séricos de estradiol. Esta descoberta indica uma ligação entre os polimorfismos COMT e os estrogénios. No entanto, em mulheres na pós-menopausa, ainda não foi encontrado uma associação entre o genótipo COMT<sup>L</sup> e níveis normais de estradiol (Stolk *et al*, 2007).

A COMT está também envolvida na degradação de catecolaminas, e resultados obtidos em estudos animais indicam que o sistema nervoso simpático tem um efeito catabólico no osso (Lorentzon *et al*, 2007).

Em suma, existem grandes estudos com base populacional, que mostraram que o polimorfismo da COMT modula a associação da BMD em homens jovens, sugerindo que interacções gene-ambiente são de extrema importância e podem exercer um impacto substancial sobre a obtenção de BMD máxima em homens. Serão necessários mais estudos do mesmo género para entender estes mecanismos em mulheres em pós-menopausa e em homens com idade avançada (Lorentzon *et al*, 2007).

## **2. Objectivos**

Este trabalho tem como principais objectivos:

- Caracterizar as frequências de três polimorfismos genéticos, MTHFR, ACP1 e COMT em DNA genómico num grupo de indivíduos com densidade mineral óssea diminuída e num grupo controlo.
- Determinar a relevância dos polimorfismos analisados com o aparecimento da doença.
- Relacionar os resultados obtidos com a obesidade e algumas co-morbilidades associadas.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 População em estudo**

##### **3.1.1 Amostras**

Neste trabalho utilizaram-se os resultados de um estudo prévio cuja base de dados já existente com DNA extraído de sangue total de indivíduos (cedido pelo Professor Dr. Mário Rui Mascarenhas, Centro de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa), dos quais existem amostras de indivíduos sem doença (dadores saudáveis) que serão os controlos deste estudo e amostras de indivíduos com densidade mineral óssea diminuída e osteoporose.

Para a obtenção de um melhor poder estatístico para a respectiva análise estatística foram adicionadas e analisadas também duas bases de dados já existentes constituídas por mulheres respectivamente pré e pós-menopáusicas, resultantes do Programa “Mexa-se Mais” e do programa “Peso”, realizados pelo Núcleo de Exercício e Saúde da Faculdade de Motricidade Humana do Prof. Dr. Luiz Sardinha, Universidade Técnica de Lisboa. Deste modo foi possível aumentar o número de indivíduos, tornando o estudo mais fiável.

##### **3.1.2 Dimensão da Amostra**

A amostra é constituída por um total de 754 indivíduos com osteoporose e massa óssea diminuída e o grupo controlo (massa óssea normal) é constituído por 641 indivíduos.

#### **3.2 Quantificação e determinação da pureza do DNA**

A quantificação (ng/ $\mu$ L) e determinação da pureza do DNA genómico (razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm) são determinadas num espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000).

### 3.3 - Genotipagem dos polimorfismos MTHFR, ACP1 e COMT por PCR-RFLP

Serão estudados três polimorfismos: MTHFR, ACP1 e COMT. A técnica predominante será o PCR RFLP (Reacção em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) e também serão feitas Electroforeses por gel de agarose a 3% e 4%, conforme os protocolos de cada polimorfismo, de modo a visualizar os produtos de restrição.

O PCR é executado de acordo com o princípio natural da replicação do DNA. É um processo que decorre em três passos e que, em conjunto se designa como um ciclo que se repete um número específico de vezes. Como foi dito anteriormente, os três passos consistem basicamente numa Desnaturação, onde a temperatura elevada (geralmente superior a 90°C) separa a cadeia dupla de DNA em duas cadeias simples que vão servir de molde. O segundo passo, Hibridização ou *Annealing*, replica a sequência de interesse (normalmente com tamanhos entre 100 e 600 pares de bases). Os *primers* marcam as extremidades da sequência alvo e consistem em sequências curtas sintéticas de nucleótidos (20 a 30 bases). Numa reacção de PCR são incluídos dois *primers*, um para cada cadeia simples de DNA que foi produzida durante o processo de desnaturação. O início da sequência de DNA alvo é marcada pelos *primers* que se ligam com a sequência complementar. A temperatura de *annealing* normalmente encontra-se entre 40°C e os 65°C, dependendo do comprimento dos *primers* e da sua sequência. A escolha criteriosa desta temperatura permite que os *primers* se liguem à sequência alvo com elevada especificidade. Por fim, o terceiro passo denominado Extensão, consiste no facto de que após a ligação dos *primers* às sequências complementares de DNA, a temperatura é elevada até cerca dos 72°C e o enzima *Taq polimerase* vai replicar a cadeia de DNA. O processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla (onde estão ligados os *primers*), incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTPs em solução. A extensão inicia-se sempre na extremidade 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. O *Taq polimerase* sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'.

No final do primeiro ciclo de PCR, encontram-se duas novas cadeias de DNA idênticas à original. Após alguns ciclos, as cadeias de DNA, que correspondem ao tamanho exacto da sequência alvo, estão presentes num número muito maior do que as

sequências de comprimento variável. Por outras palavras, a sequência flanqueada pelos *primers* é a secção do DNA que é amplificada.

Este processo tem lugar num termociclador, um equipamento que automaticamente controla e alterna as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR (geralmente entre 30 e 40 ciclos).

O PCR - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica de diferenciação através da análise de padrões derivados da clivagem do DNA.

### 3.3.1 Polimorfismo do MTHFR C677T (PCR – RFLP)

Para a determinação dos genótipos deste polimorfismo, serão amplificados fragmentos do gene que codifica a MTHFR através de PCR num volume total de 50 µl, contendo 200 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada *primer* (Forward e reverse), 25 µl de *DyNAzyme II PCR Master Mix* (1U/ µl) e um volume variável de água bidestilada e desionizada (Tabela 1).

**Tabela 1** - *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse dos polimorfismos do MTHFR, ACP1 e COMT.

Gene	Sequência do <i>Primer</i>	Fragmento de Amplificação
<b>MTHFR</b>	<b>F:</b> 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA – 3'	198 bp
	<b>R:</b> 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG - 3'	
<b>ACP1</b>	<b>F:</b> 5' – CGATCACCCATTGCAGAAG-3'	400 bp
	<b>R:</b> 5' – CCATGATTCTTAGGCAGCTC – 3'	
<b>COMT</b>	<b>F:</b> 5' – GGCTCATCACCATCGAGATCAA - 3'	111 bp
	<b>R:</b> 5' – CCAGGTCTGACAACGGGTCA – 3'	

(F- Forward; R- Reverse)

Os parâmetros escolhidos no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700) para a reacção serão: uma etapa inicial de 2 minutos a 94° (HotStart) e depois 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 61°C (annealing), 1 minuto a 72°C (extensão) e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos (Tabela 2).

**Tabela 2** - Condições de amplificação utilizadas no método de PCR para cada polimorfismo/mutação.

		<i>Desnaturação</i>	<i>Annealing</i>	<i>Extensão</i>
<b><i>MTHFR</i></b>	30 ciclos	30 s, 94°C	30 s, 61°C	1 min, 72°C + 7 min, 72°C
<b><i>ACPI</i></b>	35 ciclos	30 s, 94°C	30 s, 51°C	45s, 72°C + 5 min, 72°C
<b><i>COMT</i></b>	35 ciclos	45 s, 94°C	45 s, 60°C	1 min, 72°C + 7 min, 72°C

Após a reacção terminar, colocam-se as amostras a 4°C. Este processo irá gerar um fragmento único de 198 bp que será visível numa electroforese (tina de electroforese BIO-RAD Sub-Cell GT, fonte Biorad PowerPac 300) em gel de agarose (Lonza) a 3% em tampão TAE (20 Mm Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) com brometo de etídio a 10mg/mL.

Posteriormente, 20 µl do fragmento amplificado será digerido no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700) com 5U (0.5 µl) de enzima de restrição *Hinf I* (Fermentas), e 2µL de 10X buffer R durante 18 horas a 37°C + 65°C durante 20 minutos, seguida de um gel de agarose a 4% (Lonza), corado com brometo de etídio, para visualização das bandas no transiluminador ultravioleta (GenoSmart, VWR) (Tabela 3)



























**Tabela 3** - Enzimas de restrição utilizados na digestão dos fragmentos amplificados e genótipos possíveis com as bandas correspondentes.

<b>Enzimas de restrição</b>		<b>Genótipos</b>
<b>MTHFR</b>	<i>Hinf I</i>	CC - 198 bp
		CT -198 bp + 175 bp
		TT - 175 bp
<b>ACPI</b>	<i>Hin6I + MspAII</i>	(ver Tabela 4)
<b>COMT</b>	<i>Hin 1II</i>	HH- 89+22 bp
		HL - 89+71+22+18 bp
		LL-71+22+18 bp

### 3.3.2 Polimorfismo genético da ACP1 (PCR – RFLP)

Neste polimorfismo, serão igualmente amplificados fragmentos das amostras escolhidas do gene que codifica a ACP1 através de PCR (Tabela 1 e 2). Este processo irá gerar um fragmento único de 400 bp que será visível numa electroforese por gel de agarose a 3% (Lonza) corado com brometo de etídeo para visualização no transiluminador. O fragmento amplificado (20 µl) será digerido no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700) com duas enzimas de restrição, 2U (0.2 µl) de *Hin6I* (Fermentas) e 3U (0.3 µl) de *MspAII* (New England), ambas com 2.5 µl de tampão e 2.3/2.2 µl de água desionizada até perfazer os 25 µl, respectivamente, durante 16 horas a 37°C, seguida de um gel de agarose a 3% (Lonza), corado com brometo de etídeo, para visualização das bandas no transiluminador ultravioleta (Tabela 3 e Tabela 4).

**Tabela 4** – Representação dos genótipos da ACP1 esperados e bandas correspondentes:

	AA	AB	AC	BB	BC	CC
400 bp			 			
328 bp						
225 bp						
175 bp						
72 bp						

### 3.3.3 Polimorfismo da COMT Val158Met (PCR – RFLP)

Para a determinação dos genótipos deste polimorfismo, serão igualmente amplificados fragmentos das amostras escolhidas do gene que codifica a COMT através de PCR (Tabela 1 e 2). Após a reacção terminar, colocam-se as amostras a 4°C. Este processo irá gerar um fragmento único de 111 bp que será visível numa electroforese por gel de agarose a 3% (Lonza) corado com brometo de etídeo para visualização no transiluminador. O fragmento amplificado (20 µl) será digerido no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700) com 3U da enzima de restrição *Hin III* (Fermentas), 5 µl de tampão de restrição e 24.4 µl de água desionizada durante



18 horas a 37°C + 65°C durante 20 minutos, seguida de um gel de agarose a 4% (Lonza), corado com brometo de etídeo, para visualização das bandas no transiluminador ultravioleta (Tabela 3).

### 3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram tratados e analisados nos programas SPSS versão 21.0 e *Primer of Biostatistics* versão 5.0, sendo o nível de significância estabelecido para  $p < 0,05$ .

Para verificar se uma população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson. O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis.

Para averiguar a existência de diferenças significativas entre variáveis contínuas normais entre os grupos, recorreu-se ao teste paramétrico de análise de variância (ANOVA).

Para se verificar a intensidade da associação existente entre algumas variáveis quantitativas, realizaram-se testes de correlação de Spearman e análises multivariadas.

Para testar a semelhança entre variáveis categóricas discretas, por exemplo, o número de indivíduos com determinado polimorfismo na população de estudo e na população controlo, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson.

Com o objectivo de calcular o risco dos portadores de um determinado genótipo, calculou-se o *odds ratio* (OR). O OR define-se como a razão de probabilidades de ocorrência de determinado genótipo/alelo nos casos e nos controlos, permitindo obter uma estimativa do risco relativo.

## 4. Resultados

### 4.1 Características da população estudada

Na Tabela 5, encontram-se referidas as características bioquímicas e demográficas dos 641 controlos e dos 754 indivíduos com doença (495 com densidade mineral óssea diminuída e 259 com osteoporose) consideradas relevantes para este estudo. Nos grupos em estudo verificam-se diferenças significativas em relação ao género, idade, condição de menopausa, IMC e glicémia ( $p < 0.05$ ). Pelo contrário, em relação à idade de menopausa, insulina, HOMA (*homeostatic model assessment*), concentração de estradiol, osteocalcina, fosfatase alcalina e actividade da ACP1, não se observam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 5** – Características dos grupos controlo (indivíduos saudáveis) e em estudo (indivíduos com densidade mineral óssea diminuída e osteoporose).

Variáveis		Controlos	Osteopénia	Osteoporose	P* (X <sup>2</sup> )
Género	Feminino	542 (47.5%)	399 (34.9%)	201 (17.6%)	0.033
	Masculino	99 (39.1%)	96 (37.9%)	58 (22.9%)	
Idade		50.98±13.96	55.55±13.29	56.29±13.25	0.000
Idade de Menopausa		48.56±5.14	48.97±4.95	48.60±5.08	0.620
Condição de Menopausa	Pré-menopausa	306 (60.1%)	140 (27.5%)	63 (12.4%)	0.000
	Pós-menopausa	236 (37.3%)	259 (40.9%)	138 (21.8%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	<25	109 (34.4%)	131(41.3%)	77(24.3%)	0.000
	>25	532(49.4%)	364(33.8%)	182(16.9%)	
Glicémia (mmol)		5.09±1.53	5.22±1.62	5.42±2.24	0.047
Insulina (mcU/ml)		9.10±6.05	9.00±5.76	9.30±5.85	0.847
HOMA (mcU/ml.mmol)		2.10±1.89	2.21±1.87	2.34±2.77	0.343
Concentração de estradiol (pg/ml)		24.22±44.90	26.69±47.03	26.86±41.70	0.778
Osteocalcina (ng/ml)		7.58±7.55	6.61±6.26	7.79±9.91	0.211
Fosfatase Alcalina (U/l)		70.36±25.62	68.47±26.65	68.35±24.68	0.573
Actividade ACP1		304.33±110.56	291.66±101.78	301.08±107.42	0.489

\*Qui-quadrado de Pearson,  $p < 0.05$

Visto haver diferenças significativas em relação ao IMC e à condição de menopausa, e quando se achou necessário, os polimorfismos estudados foram analisados tendo em conta estes dois parâmetros.

Relativamente aos parâmetros estudados e aos indivíduos com doença (densidade mineral óssea diminuída e osteoporose), realizou-se uma correlação de Spearman (Tabela 6), onde se verificou que a idade está directamente relacionada com a idade de menopausa, níveis de glicémia e o HOMA ( $p=0.010$ ,  $p=0.000$  e  $p=0.002$ , respectivamente) mas está inversamente relacionada com a concentração de estradiol ( $r=-0.304$ ;  $p=0.000$ ).

Constatou-se também que o IMC está correlacionado directamente com a insulinémia e o HOMA ( $p=0.045$ ;  $p=0.019$ , respectivamente).

**Tabela 6** -Correlação de Spearman entre parâmetros para os indivíduos com doença e controlo.

Parâmetros Estudados	Correlação de Spearman	
	Doentes	Controlo
<b>Correlação Directa</b>	<p>Idade — Idade menopausa (<math>r=0.129</math>, <math>p=0.010</math>)</p> <p>Idade — Glicémia (<math>r=0.358</math>, <math>p=0.000</math>)</p> <p>Idade — HOMA (<math>r=0.130</math>, <math>p=0.002</math>)</p> <p>IMC — Insulinémia (<math>r=0.083</math>, <math>p=0.045</math>)</p> <p>IMC — HOMA (<math>r=0.097</math>, <math>p=0.019</math>)</p>	<p>Idade — Glicémia (<math>r=0.455</math>, <math>p=0.000</math>)</p> <p>Idade — HOMA (<math>r=0.116</math>, <math>p=0.009</math>)</p> <p>Idade de menopausa <math>\Rightarrow</math> IMC (<math>r=0.147</math>; <math>p=0.024</math>)</p> <p>Glicémia — Idade (<math>r=0.455</math>, <math>p=0.000</math>)</p> <p>Glicémia — Insulinémia (<math>r=0.252</math>, <math>p=0.000</math>)</p> <p>Glicémia — HOMA (<math>r=0.486</math>, <math>p=0.000</math>)</p>
<b>Correlação Inversa</b>	Idade $\Rightarrow$ Concentração de estradiol ( $r=-0.304$ ; $p=0.000$ )	Idade $\Rightarrow$ Concentração de estradiol ( $r=-0.262$ ; $p=0.000$ )

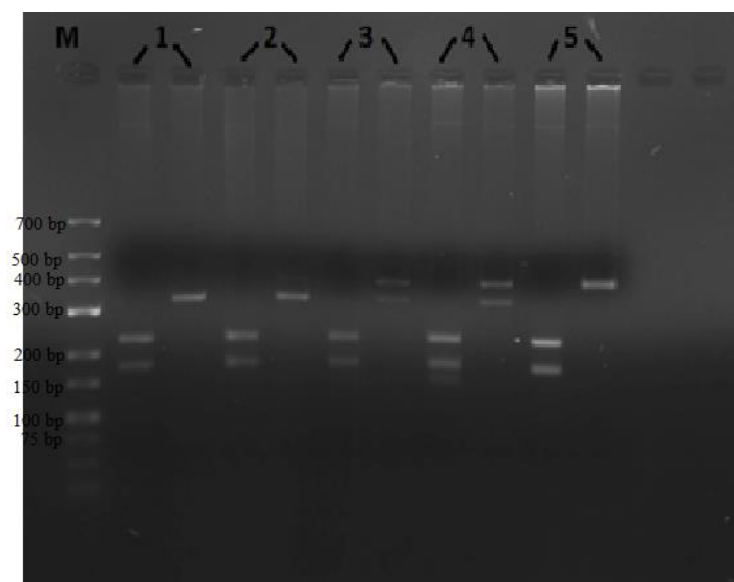
Efectuou-se o mesmo estudo de correlações em relação aos indivíduos controlo (massa óssea normal) (Tabela 6) e verificou-se que a idade está inversamente relacionada com a concentração de estradiol ( $r = -0.262$ ;  $p = 0.000$ ) mas directamente associada aos níveis de glicémia e o HOMA ( $p = 0.000$  e  $p = 0.009$ , respectivamente). A idade de menopausa correlaciona-se directamente com o IMC ( $p = 0.024$ ) e por fim, os níveis de glicémia correlacionam-se também de modo directo com a idade, níveis de insulinémia e HOMA ( $p = 0.000$ ;  $p = 0.000$ ;  $p = 0.000$ , respectivamente).

## 4.2 Genotipagem dos polimorfismos por PCR-RFLP

### 4.2.1 ACP1 – Fosfatase Ácida do eritrócito ou Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP)

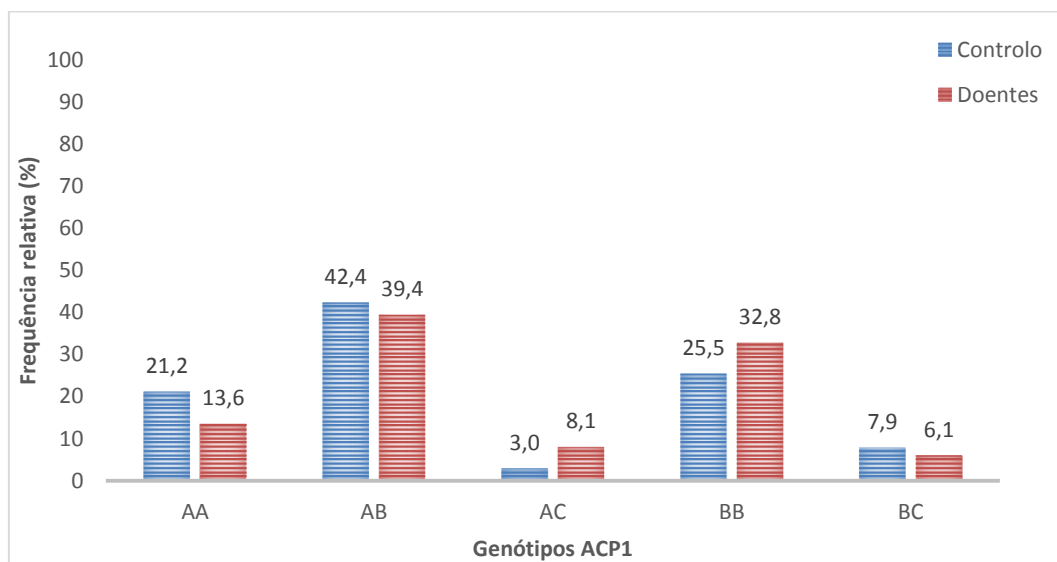
#### Identificação do polimorfismo da ACP1

Na figura 8, encontram-se representados alguns dos genótipos resultantes do polimorfismo da ACP1, após digestão.



**Figura 8** - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP da ACP1. M - Marcador, canal 1 – BB, canal 2, 3 e 4- AB; canal 5 - AA.

Quanto a este polimorfismo, foram analisados 363 indivíduos relativamente à classificação quanto à doença. Deste total, 165 indivíduos têm massa óssea normal (controlo) e 198 têm densidade mineral óssea diminuída e/ou osteoporose (doentes) (figura 9).



**Figura 9** – Representação gráfica da distribuição dos genótipos da ACP1 em relação à classificação quanto à doença.

Na Tabela 7, foram realizadas as frequências dos genótipos da ACP1 em relação à doença e verificou-se, através do teste qui-quadrado, que existe uma tendência estatística ( $\chi^2 = 9.287$  e  $p = 0.054$ ).

**Tabela 7** - Frequências genotípicas do polimorfismo ACP1 nos indivíduos controlo e doentes (osteopénia + osteoporose).

Genótipos ACP1	Classificação quanto à doença		P*
	Normal	Osteopénia + Osteoporose	
	N (%)		
AA	35 (21.2%)	27 (13.6%)	0.054
AB	70 (42.4%)	78 (39.4%)	
AC	5 (3.0%)	16 (8.1%)	
BB	42 (25.5%)	65 (32.8%)	
BC	13 (7.9%)	12 (6.1%)	
Total	N= 165	N=198	

\*teste qui-quadrado dos genótipos, nível de significância <0.05

Separando a amostra pela condição de menopausa (pré-menopausa e pós-menopausa + homens), verificou-se haver diferenças significativas nas mulheres em pré-menopausa ( $\chi^2 = 13.872$  e  $p = 0.008$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Frequências genotípicas do polimorfismo ACP1 nos indivíduos controlo e doentes (osteopénia + osteoporose), separando a amostra pela condição de menopausa.

Condição de Menopausa	Genótipos ACP1	Classificação quanto à doença		P*
		Normal	Osteopénia + Osteoporose	
		N (%)		
Pré-menopausa	AA	27 (30.7%)	7 (13.5%)	0.008
	AB	32 (36.4%)	13 (25.0%)	
	AC	3 (3.4%)	1 (1.9%)	
	BB	18 (20.5%)	25 (48.1%)	
	BC	8 (9.1%)	6 (11.5%)	
		N=88	N=52	
Pós-menopausa + homens	AA	8 (10.4%)	20 (13.7%)	0.247
	AB	38 (49.4%)	65 (44.5%)	
	AC	2 (2.6%)	15 (10.3%)	
	BB	24 (31.2%)	40 (27.4%)	
	BC	5 (6.5%)	6 (4.1%)	
		N=77	N=146	

\*teste qui-quadrado dos genótipos, nível de significância  $<0.05$

Como é visível no Tabela 9, encontrou-se uma associação entre o polimorfismo genético da ACP1 e a sua actividade enzimática com valores mais elevados para os genótipos portadores do alelo C (AC, BC), valores intermédios nos BB e valores mais baixos nos AA e AB, tanto nos indivíduos controlo como nos doentes ( $p = 0.039$  e  $p = 0.000$ , respectivamente).

**Tabela 9** – Relação entre os genótipos da ACP1 e a sua actividade enzimática.

\*Significância do teste ANOVA,  $p < 0.05$

		Actividade ACP1		
	Genótipos ACP1	N	Média ± Desvio Padrão	P*
<b>Controlo</b>	<b>AA</b>	23	271.50 ± 95.28	<b>0.039</b>
	<b>AB</b>	50	280.88 ± 78.53	
	<b>AC</b>	4	343.04 ± 36.73	
	<b>BB</b>	28	346.73 ± 123.16	
	<b>BC</b>	8	303.99 ± 157.76	
	<b>Total</b>	113		
<b>Doentes</b>	<b>AA</b>	18	240.13 ± 92.85	<b>0.000</b>
	<b>AB</b>	64	287.13 ± 81.06	
	<b>AC</b>	14	415.64 ± 111.53	
	<b>BB</b>	60	287.78 ± 101.04	
	<b>BC</b>	8	486.25 ± 118.33	
	<b>Total</b>	164		

De acordo com o Tabela 10, o genótipo AC é o que está associado a um maior risco relativo para o aparecimento da doença comparativamente com os outros genótipos ( $p=0.006$ ), com os valores ajustados para a obesidade, seguido do genótipo intermédio BB ( $p=0.041$ ).

**Tabela 10** - Risco relativo para associação entre os genótipos da ACP1 e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

<i>Genótipos</i>	<i>Controlo</i> <i>N (%)</i>	<i>Doentes</i> <i>N (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95% IC</i>	<i>P*</i>
<b>AA</b>	35 (21.2%)	27 (13.6%)	1		0.063
<b>AB</b>	70 (42.4%)	78 (39.4%)	1.672	0.892-3.132	0.109
<b>AC</b>	5 (3.0%)	16 (8.1%)	5.058	1.583-16.162	<b>0.006</b>
<b>BB</b>	42 (25.5%)	65 (32.8%)	1.980	1.029-3.811	<b>0.041</b>
<b>BC</b>	13 (7.9%)	12 (6.1%)	1.401	0.526-3.727	0.050

\*nível de significância  $< 0.05$

Realizou-se novamente uma correlação de Spearman, separando os indivíduos com doença pelos genótipos *fast* e *slow*. Nos genótipos *slow*, observou-se uma correlação directa da fosfatase alcalina com a insulinémia e o HOMA ( $r=0.329$ ,  $p=0.003$  e  $r=0.326$ ,  $p=0.003$ , respectivamente) e verificou-se também uma correlação directa da glicémia com a insulinémia ( $r=0.345$ ;  $p=0.000$ ) e *HOMA* ( $r=0.573$ ;  $p= 0.000$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11** - Correlação de Spearman entre a Osteocalcina, Fosfatase alcalina, Glicémia, Insulinémia e *HOMA* para os indivíduos com doença, em genótipos *slow* e *fast* da ACP1.

Parâmetros Estudados (Doença)	Correlação de Spearman	
	Genótipos <i>slow</i> da ACP1	Genótipos <i>fast</i> da ACP1
<b>Correlação directa</b>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">Fosfatase Alcalina</div> <div style="margin-left: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 5px;">{</div> <div> Insulinémia (<math>r=0.329</math>, <math>p=0.003</math>) </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 5px;">}</div> <div> HOMA (<math>r=0.326</math>, <math>p=0.003</math>) </div> </div> </div> </div>	_____
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">Glicémia</div> <div style="margin-left: 10px;"> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 5px;">{</div> <div> Insulinémia (<math>r=0.345</math>, <math>p=0.000</math>) </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 5px;">}</div> <div> HOMA (<math>r=0.573</math>, <math>p=0.000</math>) </div> </div> </div> </div>	
<b>Correlação inversa</b>	_____	Osteocalcina $\rightarrow$ Glicémia ( $r= -0.719$ ; $p= 0.045$ )

Relativamente aos genótipos *fast*, é de salientar a correlação inversa verificada na osteocalcina com a glicémia ( $r= -0.719$ ,  $p=0.045$ ) (Tabela 11).

Realizou-se ainda um teste ANOVA (Tabela 12), relacionando o glutathione redutase com os genótipos da ACP1, verificando-se diferenças significativas ( $p=0.001$ ), em indivíduos com doença.



**Tabela 12** - Relação entre os genótipos da ACP1 e o glutatono redutase.

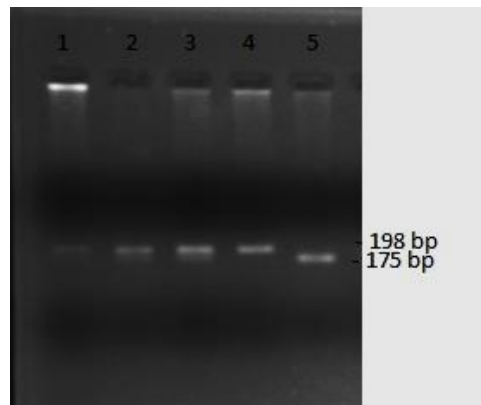
		<b>Glutatioono Redutase</b>		
	<b>Genótipos ACP1</b>	<b>N</b>	<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>P*</b>
<b>Controlos</b>	<b>AA</b>	2	40.88 ± 10.68	<b>0.658</b>
	<b>AB</b>	12	35.34 ± 6.55	
	<b>AC</b>	1	31.7	
	<b>BB</b>	11	35.11 ± 5.31	
	<b>BC</b>	2	39.13 ± 7.35	
	Total	28		
<b>Doentes</b>	<b>AA</b>	3	37.21 ± 2.41	<b>0.001</b>
	<b>AB</b>	29	35.59 ± 6.14	
	<b>AC</b>	10	44.72 ± 5.04	
	<b>BB</b>	22	36.40 ± 4.85	
	<b>BC</b>	4	38.30 ± 3.85	
	Total	68		

\*Significância do teste ANOVA, p <0.05

#### 4.2.2 Polimorfismo do MTHFR C677T

##### Identificação do polimorfismo do MTHFR

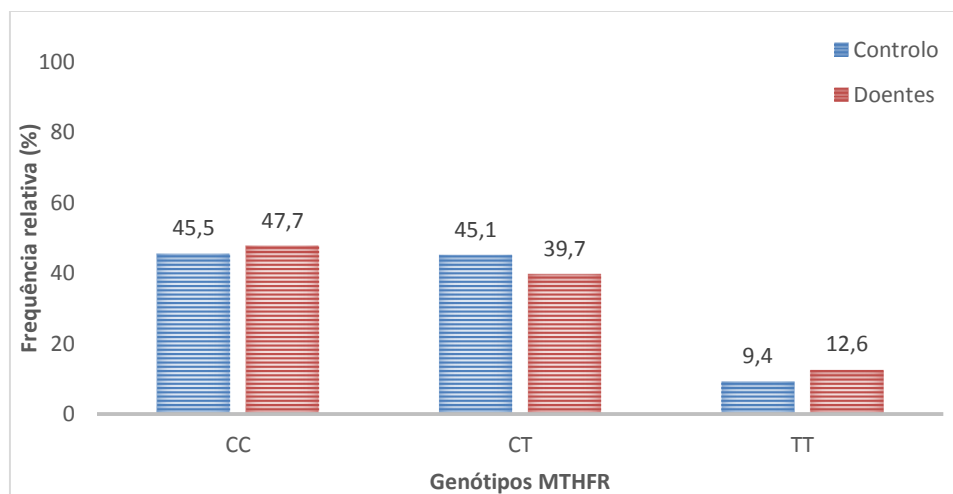
Na figura 10 encontram-se representados os diferentes genótipos deste polimorfismo, após digestão.



**Figura 10** - Electroforese em gel de agarose a 4% de fragmentos de PCR-RFLP do MTHFR.

Canal 1 e 4 – CC, canal 2 e 3 - CT; canal 5 - TT.

No geral, neste polimorfismo, foram analisados 235 indivíduos controlo e 302 indivíduos com doença, como é visível na figura 11.



**Figura 11** – Representação gráfica da distribuição dos genótipos do MTHFR em relação à classificação quanto à doença.

Foram determinadas as frequências dos genótipos do MTHFR em relação à doença, sendo os grupos separados por IMC inferior e superior a 25 kg/m<sup>2</sup> (Tabela 13). Verificou-se, através do teste qui-quadrado, que existem diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) no grupo de indivíduos com IMC > 25 ( $\chi^2 = 9.853$  e  $p = 0.043$ ).

**Tabela 13** - Frequências genotípicas do polimorfismo MTHFR nos indivíduos controlos e doentes (osteopénia e osteoporose).

Genótipos		Classificação quanto à doença			P*
IMC (kg/m²)	MTHFR	Normal	Osteopénia	Osteoporose	
		N (%)			
<25	CC	17 (41.5%)	32 (50.8%)	9 (36%)	0.738
	CT	19 (46.3%)	24 (38.1%)	12 (48%)	
	TT	5 (12.2%)	7 (11.1%)	4 (16%)	
		N=41	N=63	N=25	
>25	CC	90 (46.4%)	54 (42.2%)	49 (57%)	0.043
	CT	87 (44.8%)	60 (46.9%)	24 (27.9%)	
	TT	17 (8.8%)	14 (10.9%)	13 (15.1%)	
		N=194	N=128	N=86	

\*teste qui-quadrado dos genótipos, nível de significância <0.05

Por outro lado, o genótipo TT é o que está associado a um maior risco relativo comparativamente com os outros genótipos, embora não se tenham registado diferenças significativas, com os valores ajustados para a obesidade (Tabela 14).

**Tabela 14** - Risco relativo para associação entre os genótipos do MTHFR e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

Genótipos	Controlo N (%)	Doentes N (%)	OR	95% IC	P*
CC	107 (45.5%)	144 (47.7%)	1		0.538
CT	106 (45.1%)	120 (39.7%)	0.783	0.192-3.194	0.733
TT	22 (9.4%)	38 (12.6%)	4.921	0.234-103.695	0.306

\*nível de significância <0.05

Como existem estudos anteriores que demonstram uma associação entre o polimorfismo do MTHFR e a actividade da ACP1, efectuou-se um teste ANOVA

(Tabela 15), onde se verificou haver diferenças significativas entre estes dois parâmetros ( $p=0.024$ ) nos indivíduos com doença.

**Tabela 15** – Relação entre os genótipos do MTHFR e a actividade da ACP1.

		<b>Actividade ACP1</b>		
	Genótipos	N	Média ± Desvio Padrão	P*
<b>Controlo</b>	<b>CC</b>	55	320,27± 110.57	0.609
	<b>CT</b>	43	334.01± 111.47	
	<b>TT</b>	7	292.96± 65.24	
	Total	105		
<b>Doentes</b>	<b>CC</b>	77	283.62 ± 98.71	<b>0.024</b>
	<b>CT</b>	66	328.13 ± 114.63	
	<b>TT</b>	20	273.25± 111.07	
	Total	163		

\*Significância do teste ANOVA,  $p < 0.05$

Realizou-se também uma correlação de Spearman para alguns parâmetros entre os indivíduos controlo e os doentes, para este polimorfismo. Como está referido no Tabela 16, para o grupo controlo verificou-se uma correlação directa entre a osteocalcina e a glicémia para o genótipo CC ( $r= 0.405$ ;  $p=0.014$ ), correlações também directas entre a glicémia e a insulinémia e o HOMA ( $r=0.401$ ;  $p= 0.000$  e  $r=0.627$ ;  $p= 0.000$ ) para o genótipo CT e entre a insulinémia e o HOMA ( $r= 0.914$ ;  $p=0.000$ ) para o genótipo TT. Relativamente ao grupo dos doentes, também se verificaram correlações directas entre a fosfatase alcalina e a insulinémia ( $r= 0.262$ ,  $p=0.034$ ) para o genótipo CC, entre a glicémia e a insulinémia e o HOMA ( $r=0.239$ ;  $p= 0.015$  e  $r=0.546$ ;  $p= 0.000$ , respectivamente) para o genótipo CT e entre a osteocalcina e a insulinémia e o HOMA ( $r=0.658$ ;  $p= 0.008$  e  $r=0.702$ ;  $p= 0.004$ , respectivamente) para o genótipo TT.

**Tabela 16** - Correlação de Spearman entre a Osteocalcina, Fosfatase alcalina, Glicémia, Insulinémia e *HOMA* para os indivíduos controle e doentes, nos genótipos do MTHFR.

Genótipos MTHFR	Correlação de Spearman	
	Controlo	Doentes
<b>CC</b>	Osteocalcina $\Rightarrow$ Glicémia ( $r= 0.405$ , $p=0.014$ )	Fosfatase alcalina $\Rightarrow$ Insulinémia ( $r= 0.262$ , $p=0.034$ )
<b>CT</b>	Glicémia $\left\{ \begin{array}{l} \text{Insulinémia} \\ (r=0.401, p=0.000) \\ \text{HOMA} \\ (r=0.627, p=0.000) \end{array} \right.$	Glicémia $\left\{ \begin{array}{l} \text{Insulinémia} \\ (r=0.239, p=0.015) \\ \text{HOMA} \\ (r=0.546, p=0.000) \end{array} \right.$
<b>TT</b>	Insulinémia $\Rightarrow$ HOMA ( $r= 0.914$ , $p=0.000$ )	Osteocalcina $\left\{ \begin{array}{l} \text{Insulinémia} \\ (r=0.658, p=0.008) \\ \text{HOMA} \\ (r=0.702, p=0.004) \end{array} \right.$

\*nível de significância,  $p < 0.05$

Realizou-se ainda outro teste ANOVA, relacionando os genótipos do MTHFR com os valores da glutatióno redutase (Tabela 17), onde também se verificaram diferenças significativas ( $p=0.023$ ) entre estes dois parâmetros, para indivíduos com doença.

**Tabela 17** - Relação entre os genótipos do MTHFR e o glutatióno redutase.

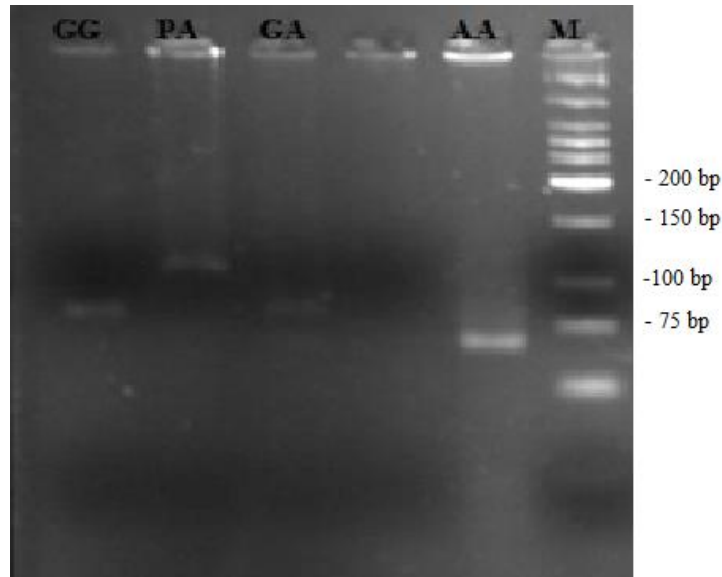
Glutatióno Redutase				
	Genótipos	N	Média $\pm$ Desvio Padrão	P*
<b>Controlos</b>	<b>CC</b>	12	35,32 $\pm$ 5.84	0.821
	<b>CT</b>	15	36.24 $\pm$ 6.74	
	<b>TT</b>	2	33.53 $\pm$ 1.91	
	Total	29		
<b>Doentes</b>	<b>CC</b>	48	36,14 $\pm$ 5.12	<b>0.023</b>
	<b>CT</b>	35	39.60 $\pm$ 6.04	
	<b>TT</b>	5	36.45 $\pm$ 7.03	
	Total	88		

\*Significância do teste ANOVA,  $p < 0.05$

#### 4.2.3 Polimorfismo da COMT Val158Met

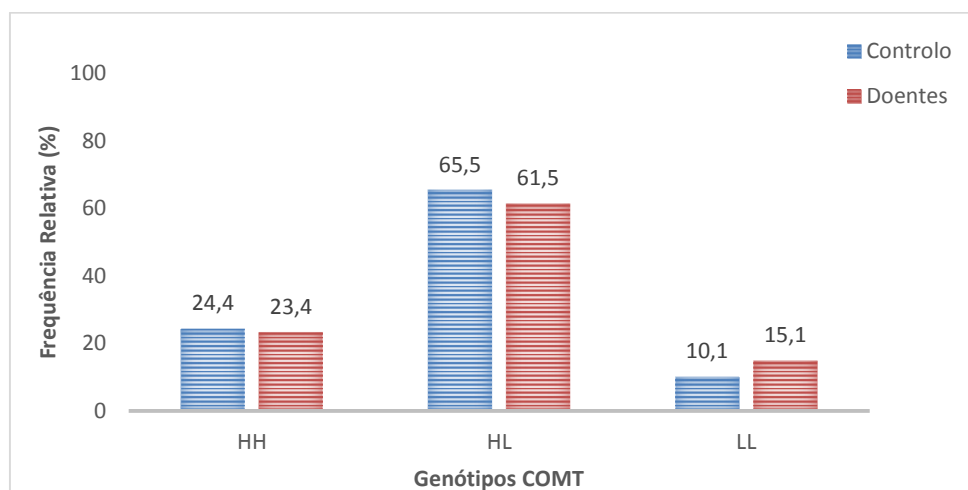
##### Identificação do polimorfismo da COMT

Na figura 12, encontram-se representados os genótipos resultantes do polimorfismo da COMT, após digestão.



**Figura 12** - Electroforese em gel de agarose a 4% de fragmentos de PCR-RFLP da COMT. 1 - HH, 2- Produto de amplificação; 3- HL; 5- LL; 6 - marcador de pesos moleculares

Neste polimorfismo, foram analisados 360 indivíduos em relação à classificação quanto à doença, como é visível na figura 13. Deste total, 168 indivíduos têm massa óssea normal e 192 têm densidade mineral óssea diminuída e/ou osteoporose.



**Figura 13** – Representação gráfica da distribuição dos genótipos da COMT em relação à classificação quanto à doença.

Realizaram-se as frequências genótípicas deste polimorfismo nos indivíduos controlos e doentes, onde não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabela 18).

**Tabela 18** - Frequências genótípicas do polimorfismo COMT nos indivíduos controlos e doentes (osteopénia + osteoporose).

Genótipos COMT	Classificação quanto à doença		P*
	Normal	Osteopénia + Osteoporose	
	N (%)		
HH	41 (24.4%)	45 (23.4%)	0.367
HL	110 (65.5%)	118 (61.5%)	
LL	17 (10.1%)	29 (15.1%)	
	N= 168	N=192	

\*teste qui-quadrado dos genótipos, nível de significância  $< 0.05$ .

Na Tabela 19, apesar de não haver diferenças significativas, verificou-se uma tendência para o genótipo intermédio HL ( $OR = 0.213$ ,  $p = 0.053$ ) representar um menor risco para o desenvolvimento da doença.

**Tabela 19** - Risco relativo para associação entre os genótipos da COMT e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade.

Genótipos	Controlo N (%)	Doentes N (%)	OR	95% IC	P*
<b>HH</b>	41 (24.4%)	45 (23.4%)	1		0.154
<b>HL</b>	110 (65.5%)	118 (61.5%)	0.213	0.045-1.022	<b>0.053</b>
<b>LL</b>	17 (10.1%)	29 (15.1%)	0.289	0.029-2.880	0.290

\*nível de significância  $< 0.05$

## 5. Discussão

Problemas de saúde pública associados à obesidade e à osteoporose partilham factores genéticos e factores ambientais comuns. O aumento do peso corporal reforça o osso, o que pode diminuir o risco da osteoporose através do aumento da densidade mineral óssea (BMD), um indicador bem conhecido para a osteoporose (Cha *et al*, 2012; Jeon *et al*, 2011). No entanto, a inflamação é mais grave em indivíduos com elevada resistência à insulina do que em pessoas com baixa resistência à insulina, resultando eventualmente numa BMD reduzida (Jeon *et al*, 2011).

Estudos recentes têm sugerido que a acumulação de massa gorda abdominal, independentemente do índice de massa corporal (IMC), pode aumentar a predisposição para o risco de osteoporose através da redução da BMD (Cha *et al*, 2012). Portanto, enquanto o ganho de peso pelo aumento da massa corporal magra pode ter uma influência benéfica sobre a saúde óssea (carga mecânica), o ganho de peso decorrente do aumento da massa gorda (principalmente abdominal) podem influenciar negativamente a formação óssea (efeito fisiológico) (Cha *et al*, 2012).

Este estudo reforçou o facto de que a osteoporose é influenciada pelo género, sendo mais predominante em mulheres; pela idade (acima dos 55 anos); pela condição de menopausa, observando-se maior incidência da doença em mulheres em pós-menopausa; pelo IMC, havendo maior prevalência da doença em indivíduos com IMC  $<25 \text{ kg/m}^2$  e pelos níveis de glicémia, com níveis mais elevados em doentes com osteoporose.

Relativamente aos parâmetros estudados e aos indivíduos com doença (densidade mineral óssea diminuída e osteoporose), verificou-se que a idade está positivamente relacionada com a idade de menopausa, níveis de glicémia, o HOMA e negativamente relacionada com a concentração de estradiol ( $p= 0.010$ ;  $p= 0.000$  e  $p= 0.002$ ;  $p= 0.000$ , respectivamente). A idade, como se sabe, está directamente relacionada com o momento em que surge a menopausa, bem como existe uma tendência para os níveis de glicémia aumentarem com o avançar da idade. O HOMA, por sua vez, é um método utilizado para quantificar a resistência à insulina e a função das células beta do pâncreas. Os seus valores aumentam pois estão directamente associados à idade. Relativamente à concentração de estradiol, está negativamente



relacionada com a idade, pois há um decaimento das hormonas esteróides sexuais com a progressão da idade.

Constatou-se também que o IMC está correlacionado directamente com a insulinémia e o HOMA ( $p= 0.045$ ;  $0.019$ , respectivamente). Indivíduos com um índice de massa corporal elevada têm os seus níveis de insulina aumentados e por sua vez, a resistência à mesma.

Ao realizar-se o mesmo estudo de correlações em relação aos indivíduos controlo (massa óssea normal), verificou-se o mesmo género de correlações, não se destacando nenhum parâmetro.

### **Polimorfismo genético da ACP1**

A fosforilação e desfosforilação de proteínas são mecanismos centrais que mediam eventos de transdução de sinal envolvidos numa ampla variedade de processos celulares. As proteínas tirosina fosfatase estão presentes em todas as células eucariotas e têm um papel crucial na regulação da fosforilação de proteínas, revertendo a acção das proteínas cinases e, portanto, modulando diversos processos celulares, tais como a progressão do ciclo celular, regulação da transcrição, crescimento celular, diferenciação e apoptose (Chiarugi *et al*, 2002; Malaspina *et al*, 2009).

Nos últimos anos, foram identificadas quatro classes de proteínas tirosina fosfatases (PTP), incluindo as proteínas tirosina fosfatases de baixo peso molecular (LMW-PTP). As LMW-PTP distinguem-se das outras proteínas da mesma família através da presença de duas cisteínas nas posições 12 e 17, enquanto as outras só possuem uma. Isto confere a capacidade de uma recuperação rápida da sua actividade após uma acção oxidativa, actuando como um sensor intracelular para a intensidade do *status* redox. Neste contexto, sabe-se que a regulação da actividade da LMW-PTP pode ocorrer num sistema redox e que o óxido nítrico (NO) e o  $H_2O_2$  inactivam reversivelmente esta proteína (Chiarugi *et al*, 2002; Malaspina *et al*, 2009).

Relativamente ao estudo das frequências genótípicas nos indivíduos controlo e nos doentes, observou-se uma tendência estatística ( $p=0.054$ ). Verificou-se um aumento no número de indivíduos com doença nos genótipos AC (8.1%) e BB (32.8%), relativamente aos controlos com uma percentagem de 3.0% e 25.5%, respectivamente.

No mesmo estudo, ao dividir-se a população pela condição de menopausa (pré-menopausa e pós menopausa + homens) verificaram-se resultados estatisticamente significativos para as mulheres em pré-menopausa ( $p=0.008$ ). Ou seja, registou-se uma diminuição da percentagem de doentes para todos os genótipos em relação ao grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois nas mulheres em pré-menopausa, o aparecimento da doença é menor pois existe um funcionamento hormonal normal, o que leva a uma função normal nos mecanismos de reabsorção óssea.

Em relação à associação entre o polimorfismo genético da ACP1 e a sua actividade enzimática, os resultados foram de acordo com o esperado, onde os valores mais elevados das actividades enzimáticas estão associados às isoformas *fast* e os valores mais baixos, às isoformas *slow*.

A ACP1 é altamente polimórfica e apresenta no seu gene três alelos (A,B,C) que codificam proporções de isoenzimas *fast* e *slow* com localizações celulares e funções diferentes (Wilder & Hammer, 2006). Esta apresenta variações na sua actividade que estão dependentes do seu genótipo, da sua actividade de fosfotransferase e da modulação por folatos e purinas. As actividades da enzima variam de genótipo para genótipo, sendo que o alelo \*A está associado à actividade enzimática mais baixa, o alelo \*B à actividade intermédia e o alelo \*C à mais elevada. As proporções entre *f/s* para os diferentes alelos são as seguintes: 2:1 no alelo \*A, 4:1 no alelo \*B e 1:4 no alelo \*C, sendo a actividade total da enzima (*fast/slow*) de cerca de 2:3:4 para ACP1 A, ACP1 B e ACP1 C respectivamente. Esta relação *f/s* parece não apresentar variações de tecido para tecido, sugerindo que esta razão seja constitutiva e determinada geneticamente (Martins *et al*, 2008).

No estudo das correlações de Spearman, separaram-se os indivíduos com doença pelos genótipos *fast* e *slow* deste polimorfismo. Nos genótipos *slow*, é de salientar a correlação directa da fosfatase alcalina com a insulinémia e o HOMA ( $p=0.003$  e  $p=0.003$ , respectivamente). Estes resultados podem dever-se ao facto dos indivíduos com osteoporose terem níveis mais elevados de insulina e por sua vez de HOMA e a resposta à insulina pode influenciar a fosfatase alcalina.

Relativamente aos genótipos *fast*, destaca-se a correlação negativa da osteocalcina com a glicémia ( $r= -0.719$ ,  $p=0.045$ ). Níveis mais baixos de osteocalcina podem levar à redução da secreção de insulina e adiponectina, resistência à insulina e ao

aumento da glicémia e da adiposidade, estando envolvida na produção de células beta no pâncreas, que é tanto maior quanto maior a activação da expressão génica dessa proteína.

Os processos de reabsorção e formação óssea são sistemas que se complementam e são dependentes. A predominância de um sobre o outro resulta num ganho ou perda de massa óssea. É este dinamismo que se pretende num bom marcador de remodelação óssea. Os níveis de osteocalcina e de fosfatase alcalina óssea representam eficazmente o processo de formação óssea.

Num estudo realizado por Malaspina *et al* (2009), a regulação da actividade da LMW-PTP durante a diferenciação dos osteoblastos sugeriu seguir um percurso redox, sob a influência do glutathione.

O glutathione redutase é o enzima que recicla um dos mais importantes redutores intracelulares, o glutathione. Este tripéptido está envolvido na protecção contra agentes de citotoxicidade electrofílica e metabolitos e está também envolvido na regulação dos efeitos do stresse oxidativo em células, mantendo desta maneira o equilíbrio redox intracelular. O glutathione redutase é responsável pela reactivação de algumas proteínas, tais como as LMW-PTP, após sofrerem stresse oxidativo. Acredita-se que o processo de redução responsável pela recuperação da actividade das LMW-PTP acontece sob controlo do sistema *glutaredoxina/glutathione/glutathione redutase/NADPH* e que o papel do glutathione redutase nas proteínas fosfatases é de proteger o derivado sulfénico de mais oxidação. Neste estudo mostrou-se que a actividade da LMW-PTP e os níveis de glutathione redutase são finamente modulados durante a diferenciação dos osteoblastos (Abdelsaid & El-Remessy, 2012; Malaspina *et al*, 2009).

De acordo com os resultados do presente estudo, verificou-se que nos indivíduos com doença, os genótipos com actividades enzimáticas mais elevadas (AC e BC) têm níveis de glutathione redutase também mais elevados ( $44.72 \pm 5.04$  e  $38.30 \pm 3.85$ , respectivamente). Estes resultados não são concordantes com outros estudos realizados.

Segundo um estudo realizado por Apelt *et al* (2009) e Teruel *et al* (2011), existe uma interacção negativa entre a ACP1 e a enzima glutathione redutase (GR), que afecta a concentração celular do seu cofactor FAD. O GR é uma flavoenzima envolvida no

mecanismo antioxidante celular que reduz o glutathione dissulfureto oxidado (GSSG) para a forma de glutathione (GSH), que é um antioxidante celular importante. Actividades mais baixas da ACP1 aumentam os níveis de cofator FAD no citosol levando a um aumento da actividade do glutathione redutase, enquanto actividades mais elevadas de ACP1, baixam a actividade do glutathione redutase.

A ingestão de riboflavina em termos nutricionais pode alterar esta dinâmica, pois disponibiliza uma fonte mais directa de FAD, tendo um maior efeito na actividade do glutathione redutase do que o genótipo da ACP1 ou a sua actividade (Apelt *et al*, 2009).

Este factor da ingestão de riboflavina poderá explicar a não concordância dos resultados neste estudo, onde ao contrário dos estudos referidos, as actividades mais elevadas de ACP1 apresentam também níveis mais elevados de glutathione redutase. Outro factor que pode estar a influenciar estes resultados é a obesidade observada e registada em grande parte dos indivíduos incluídos neste estudo.

No presente estudo e de acordo com o Tabela 10, o genótipo AC é o que apresenta um maior risco relativo associado ao aparecimento da doença comparativamente com os outros genótipos ( $p=0.006$ ), com os valores ajustados para a obesidade, seguido do genótipo intermédio BB ( $p=0.041$ ). Isto sugere que genótipos com actividades enzimáticas mais elevadas têm uma maior propensão para o aparecimento da doença. Actividades superiores levam a uma actividade menor da Src cinase, havendo um desequilíbrio nos mecanismos de remodelação óssea.

### **Polimorfismo genético do MTHFR**

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido que contém tiol formado durante o metabolismo da metionina. Recentemente, várias evidências indicam que níveis elevados de homocisteína estão envolvidos na patologia da osteoporose e fracturas ósseas (Hong *et al*, 2007). A Hcy demonstrou ser um forte pró-oxidante *in vivo* e *in vitro*. Além disso, as linhagens de osteoclastos são muito sensíveis ao stresse oxidativo, com a formação de osteoclastos estimulados pelo aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio intracelulares (ROS) (Koh *et al*, 2006).

Sabe-se que várias enzimas, incluindo 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), desempenham um papel chave no metabolismo da homocisteína. Uma mutação pontual no gene da MTHFR (C677T), que induz uma substituição de valina por alanina, é uma variante comum e que está associada com uma actividade enzimática reduzida e com o aumento dos níveis de homocisteína (Hong *et al*, 2007; Koh *et al*, 2006). Estudos anteriores demonstraram uma associação entre este polimorfismo e a BMD, o que poderia apoiar o papel da homocisteína ou do folato no metabolismo ósseo. No entanto, os resultados de estudos sobre o polimorfismo e o risco de fractura não são concordantes (Gjesdal *et al*, 2006).

No estudo de Gjesdal *et al*. (2006) com uma grande base populacional e com associações entre factores relacionados com a homocisteína e o BMD total da anca, o nível de homocisteína no plasma foi significativamente relacionado com a BMD em mulheres de meia-idade e mais velhas, mas não em homens. A relação positiva entre o nível de folato no plasma e o BMD foi observado entre mulheres, embora mais fraca do que a relação entre o nível de homocisteína e BMD. Verifica-se também que a deficiência de estrogénios está associada a um aumento moderado nos níveis plasmáticos de homocisteína e os níveis séricos de estradiol estão associados com a BMD em mulheres idosas.

Foram realizadas as frequências dos genótipos do MTHFR em relação à doença, sendo os grupos separados por IMC inferior e superior a 25 kg/m<sup>2</sup> (Tabela 11). Verificou-se que existem diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) no grupo de indivíduos com IMC > 25 ( $\chi^2=9.853$  e  $p = 0.043$ ). Neste grupo, verifica-se uma diminuição no número de indivíduos (N) com doença, para todos os genótipos, sugerindo que a obesidade poderá ser um factor protector em relação ao aparecimento da doença. Relativamente à condição da doença, verifica-se um aumento da percentagem de genótipos CC (46. 4% para 57%) e TT (8.8% para 15.1%) e uma diminuição na percentagem de genótipos CT (44.8% para 27.9%), entre o grupo controlo e os doentes.

Segundo o estudo de Hong *et al* (2007), foi demonstrado um impacto significativo e independente do genótipo C677T do MTHFR sobre o risco de fraturas em mulheres chinesas em pós-menopausa. Os genótipos CT ou TT tinham um risco aumentado de fractura que ocorre antes ou depois da menopausa. A taxa de incidência de fractura após a menopausa foi aumentada por um factor de 2,5 em portadores do

alelo T, em comparação com indivíduos portadores do genótipo CC. No entanto, também se descobriu que o efeito do genótipo CT em risco de fracturas era semelhante em grandeza ao do genótipo TT, indicando assim que o polimorfismo de MTHFR C677T representa um modelo dominante do alelo T do risco de fracturas. Com base nestes resultados, o genótipo MTHFR C677T pode desempenhar um papel independente no desenvolvimento de fracturas osteoporóticas.

Apesar de se saber que o genótipo TT está associado a um maior risco relativo comparativamente com os outros genótipos, não se registaram diferenças significativas, com os valores ajustados para a obesidade (Tabela 12). Mais uma vez, o factor obesidade poderá estar a actuar como um factor protector em relação à doença.

Outra explicação possível é o deste estudo não ter poder estatístico suficiente para detectar um pequeno aumento do risco associado aos valores de homocisteína encontrados em indivíduos TT em comparação com os genótipos CT-CC, mais abundantes. Além disso, resultados de estudos anteriores sugerem que a riboflavina pode desempenhar um papel fundamental na prevenção do BMD baixo no genótipo TT. Assim, a ingestão desigual de riboflavina pode, até certo ponto explicar porque o genótipo TT está associada com uma baixa densidade mineral óssea em algumas populações e não em outras. Outra possibilidade é a de que a associação observada entre os níveis de homocisteína no plasma e da BMD seja mediada pelo folato (Gjesdal *et al*, 2006; Yazdanpanah *et al*, 2008).

Como existem estudos anteriores que demonstram uma associação entre o polimorfismo do MTHFR e a actividade da ACP1, realizou-se um teste ANOVA (Tabela 13) e verificou-se haver diferenças significativas ( $p=0.024$ ), para o grupo dos doentes. O genótipo CT apresenta os valores mais elevados da actividade da ACP1 ( $328.13 \pm 114.63$ ), seguido dos genótipos CC e TT ( $283.62 \pm 98.71$  e  $273.25 \pm 111.07$ ). Nos doentes, as actividades são mais baixas que nos controlos, embora estejam representadas na mesma ordem.

Realizou-se ainda outro teste ANOVA, relacionando os genótipos do MTHFR com os valores da glutathione redutase (Tabela 14), onde também se verificaram diferenças significativas ( $p=0.023$ ) entre estes dois parâmetros, para os indivíduos com doença. Os valores mais elevados da glutathione redutase ( $39.60 \pm 6.04$ ) estão atribuídos ao genótipo CT, seguidos do genótipo TT e CC ( $36.45 \pm 7.03$  e  $36.14 \pm 5.12$ ,

respectivamente), embora as diferenças entre estes níveis de glutathione redutase sejam muito pequenas. Nos doentes, os níveis de glutathione redutase encontram-se ligeiramente aumentados, comparando com os níveis do grupo controlo.

Para se tornar activo, o MTHFR necessita ligar-se a um cofactor, o FAD, um derivado da riboflavina. O alelo T afecta o local de ligação para o FAD, resultado numa menor afinidade para este cofactor do que o alelo C. Esta ligação pode ser estabilizada pela adição de folato ou riboflavina (Yazdanpanah *et al*, 2008). Como já foi dito, existe uma interacção da ACP1 e o glutathione redutase, que afecta a concentração celular do seu cofactor FAD, onde se verifica que actividades mais baixas aumentam os níveis de cofactor FAD no citosol levando a um aumento da actividade do glutathione redutase, enquanto actividades mais elevadas de ACP1, baixam a actividade do glutathione.

### **Polimorfismo genético da COMT**

As fracturas osteoporóticas estão associadas com uma morbilidade e mortalidade elevadas e são consideradas um problema grave de saúde em mulheres pós-menopáusicas e em homens de meia-idade. Estudos semelhantes ao de Stolk *et al* (2007) estimam uma hereditariedade elevada da BMD (mais de 80%), turnover do osso (63%) e geometria do osso (62%), enquanto a hereditariedade do risco de fracturas é mais baixo (25-35%). Os genes envolvidos nestas características são desconhecidos.

Como se sabe, os esteróides sexuais têm um papel muito importante no desenvolvimento ósseo e, portanto, os genes que regulam a produção de esteróides sexuais e o seu metabolismo são bons candidatos para o estudo do seu envolvimento no desenvolvimento da osteoporose (Lorentzon *et al*, 2004; Stolk *et al*, 2007).

Existem vários genes candidatos na via dos estrogénios, nunca se tendo dado especial importância à variação genética de genes envolvidos na degradação dos mesmos.

A COMT é o gene que codifica para a catecol-O-metiltransferase (COMT), que inactiva os catecolestrogénios em circulação, catalisando a O-metilação dos estrogénios 2-hidroxilados e 4-hidroxilados nos seus derivados 2-OH-metoxiestrogénio e 4-OH-metoxiestrogénio (Stolk *et al*, 2007).

O polimorfismo mais conhecido do gene COMT consta duma substituição funcional de G  $\rightarrow$  A, levando à substituição de uma valina (G) por uma metionina (A) no codão 158. A variante metionina resulta na instabilidade térmica da enzima e a uma actividade enzimática 3 a 4 vezes inferior comparada com a variante valina. Os alelos são conhecidos como COMT<sup>L</sup> (actividade reduzida) e COMT<sup>H</sup> (actividade elevada). A frequência da variante metionina é de cerca de 50% em populações caucasianas (Lorentzon *et al*, 2004; Stolk *et al*, 2007).

Estudos realizados em homens de meia-idade mostraram que o alelo de actividade mais baixa está associado com níveis elevados de estradiol sérico. Esta descoberta indica uma ligação entre o polimorfismo da COMT e os estrogénios. No entanto em mulheres em pós-menopausa, não há associações descritas entre o genótipo COMT<sup>L</sup> e níveis normais de estradiol.

Com base nestes estudos e nos resultados obtidos, não se verificou nenhuma relação entre o polimorfismo da COMT e o aparecimento da doença. O mesmo se confirmou em estudos como o de Stolk *et al* (2007), em que não se registaram associações entre o genótipo COMT<sup>L</sup> e níveis normais de estradiol, em mulheres em pós-menopausa.

No entanto e nesse mesmo estudo, em homens de meia-idade, verificou-se que os portadores do alelo COMT<sup>L</sup> aumentavam o risco de fracturas osteoporóticas em cerca de 60%. Em mulheres, foi registado um risco mais elevado de ocorrência de fracturas osteoporóticas nas portadoras do alelo COMT<sup>L</sup> mas não se verificou nenhuma associação com fracturas por fragilidade (Stolk *et al*, 2007).

No presente estudo, apenas se registou uma tendência na análise do risco relativo para associação entre os genótipos da COMT e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade, para o genótipo HL (heterozigótico). Os resultados desta tendência indicam que o genótipo HL poderá ser protector em relação à doença.

Segundo Stolk *et al* (2007), isto pode dever-se ao facto de que a actividade da COMT no fígado e nos glóbulos vermelhos é cerca de 30% mais elevada em homens do que em mulheres. As mulheres por terem uma actividade da COMT mais baixa, talvez tenham desenvolvido percursos alternativos para compensar este facto.



Neste caso, o efeito do alelo COMT<sup>L</sup> seria menos dramático em mulheres do que em homens, o que pode explicar a tendência mais fraca observada em mulheres, visto o número de homens estudados ser muito mais reduzido e não significativo. Outro facto a considerar é que a obesidade poderá ter um efeito protector em relação ao aparecimento da doença, independentemente do genótipo observado.

É de referir que estes resultados obtidos contradizem um estudo feito anteriormente, onde se mostrou que o gene da COMT pode ser um gene de susceptibilidade para o desenvolvimento de osteoporose especialmente em mulheres pós-menopáusicas que não utilizam terapia hormonal de substituição. Nestas mulheres uma maior actividade da enzima poderá conduzir a uma eliminação mais rápida dos catecolestrogénios e consequentemente a diminuição da actividade dos osteoblastos relativamente aos osteoclastos e a um desequilíbrio nos mecanismos de remodelação óssea. (Monteiro *et al*, 2012)

## 6. Conclusão

Um dos principais objectivos deste trabalho era o de caracterizar as frequências de três polimorfismos genéticos, MTHFR, ACP1 e COMT, num grupo de indivíduos com osteoporose e num grupo controlo e determinar a relevância destes polimorfismos analisados com o aparecimento da doença.

No polimorfismo da ACP1, observou-se uma tendência para o aumento de indivíduos com doença com genótipos AC e BC. O genótipo AC mostrou um maior risco relativo para o aparecimento da doença, com valores ajustados para a obesidade. Verificou-se ainda que nos indivíduos com doença, os genótipos com actividades enzimáticas mais elevadas (AC e BC) têm níveis de glutathione redutase também mais elevados. Uma das possíveis explicações é a ingestão de riboflavina que pode alterar esta dinâmica. Outro factor que pode estar a influenciar estes resultados é a obesidade observada e registada em grande parte dos indivíduos incluídos neste estudo.

Observou-se também que nos genótipos *slow* os níveis de fosfatase alcalina estão directamente relacionados com os valores de insulinémia e HOMA, devido aos níveis mais elevados de insulina que os doentes têm. Esta resposta à insulina pode influenciar a fosfatase alcalina. Relativamente aos genótipos *fast* observou-se que os níveis de osteocalcina relacionam-se de modo inverso com a glicémia, sugerindo que níveis mais baixos de osteocalcina podem levar ao aumento da glicémia e da adiposidade, estando a osteocalcina envolvida na produção de células beta no pâncreas, que é tanto maior quanto maior a activação da expressão génica dessa proteína.

Em relação ao polimorfismo do MTHFR, verificou-se que para um IMC > 25 há uma diminuição no número de indivíduos com doença, para todos os genótipos, sugerindo que a obesidade é um factor protector em relação ao aparecimento da doença. Ao realizar uma associação entre o polimorfismo do MTHFR e a actividade da ACP1, verificou-se que o genótipo CT apresenta os valores mais elevados da actividade da ACP1, seguido dos genótipos CC e TT. Nos doentes, as actividades são mais baixas que nos controlos, embora estejam representadas na mesma ordem. Sabe-se que existe uma interacção entre a ACP1 e o glutathione redutase, afectando a concentração do seu cofactor FAD.

Na relação dos genótipos do MTHFR com os níveis de glutathione redutase para os indivíduos com osteoporose, observou-se que os valores mais elevados do glutathione redutase estão atribuídos ao genótipo CT, seguidos do genótipo TT e CC. Nos doentes, os níveis de glutathione redutase encontram-se ligeiramente aumentados, comparando com os níveis do grupo controlo.

Relativamente à COMT, apenas se registou uma tendência na análise do risco relativo para associação entre os genótipos da COMT e a susceptibilidade associada à osteoporose, ajustada para a obesidade, para o genótipo HL (heterozigótico). Os resultados desta tendência indicam que o genótipo HL poderá ser protector em relação à doença. O facto de não se terem obtido resultados significativos pode dever-se à heterogeneidade da amostra. Outra circunstância a considerar é a da variante da COMT poder ter mais um efeito local do que um efeito sistémico, visto não se ter verificado nenhuma associação entre este polimorfismo e a doença.

É de salientar que após pesquisa bibliográfica não foi encontrado, até à data, nenhum estudo publicado referente a estes polimorfismos na população portuguesa, nem a nível internacional, especialmente para o polimorfismo da ACP1 e suas respectivas actividades com o aparecimento da osteoporose.

## 7. Bibliografia

Abdelsaid M.A., El-Remessy A.B. (2012), S-glutathionylation of LMW-PTP regulates VEGF-mediated FAK activation and endothelial cell migration. *Journal of Cell Science* **125**, 4751-4760

Blom H.J., Smulders Y. (2011), Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* **34**:75–81

Bredella M.A., Torriani M., Ghomi R.H., Thomas B.J., Brick D.J., Gerweck A.V., Harrington L.M., Breggia A., Rosen C.J., Miller K.K. (2011), Determinants of bone mineral density in obese premenopausal women. *Bone*. **48**(4): 748–754.

Brustolin S., Giugliani R., Félix T.M. (2010), Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res*. **43**(1): 1–7.

Cha S., Yu H., Kim J.Y. (2012), Bone Mineral Density-Associated Polymorphisms Are Associated with Obesity-Related Traits in Korean Adults in a Sex-Dependent Manner. *PLoS ONE* **7**(12): e53013

Chiarugi P., Cirri P., Taddei M.L., Giannoni E., Fiaschi T., Buricchi F., Camici G., Raugei G., Ramponi G. (2002), Insight into the Role of Low Molecular Weight Phosphotyrosine Phosphatase (LMW-PTP) on Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGF-r) - Signaling LMW-PTP Controls PDGF-r Kinase Activity Through TYR-857 Dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 40, pp. 37331–37338

Crandall C.J., Newberry S.J., Diamant A., et al. (2012), Treatment To Prevent Fractures in Men and Women With Low Bone Density or Osteoporosis: Update of a 2007 Report [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); Mar. (Comparative Effectiveness Reviews, No. 53.)

Ferron M., Wei J., Yoshizawa T, Del Fattore A., DePinho R.A., Teti A., Ducy P., G. Karsenty (2012), Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. **142**(2): 296–308.

Gao L., Li H. , Li K. , Shen Z., Liu L., Li C., Zhang Z., Liu Y. (2009), Polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene in Han Chinese patients with psoriasis vulgaris *Genetics and Molecular Biology*, **32**, 1, 32-36

Gjesdal C.G., Vollset S.E., Ueland P.M., Refsum H., Drevon C.A., Gjessing H.K., Tell G.S. (2006), Plasma Total Homocysteine Level and Bone Mineral Density - The Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med*. **166**:88-94

Guo Y., Liu H., Yang T-L., Li S.M., Li S.K., Tian Q., Liu Y., Deng H. (2011), The Fat Mass and Obesity Associated Gene, FTO, Is Also Associated with Osteoporosis Phenotypes. *PLoS ONE* **6**(11): e27312.

He Y.F., Ma Y., Gao C., Zhao G.Y., Zhang L.L., Li G.F., Pan Y.Z., Li K., Xu Y.J. (2013), Iron Overload Inhibits Osteoblast Biological Activity Through Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res* **152** (2):292-6

Henriksen K., Neutzsky-Wulff A.V., Bonewald L.F., Karsdal M.A. (2009), Local communication on and within bone controls bone remodelling. *Bone* **44**:1026–1033

Herrera A., Lobo-Escolar A., Mateo J., Gil J., Ibarz E., Gracia L. (2012), Male osteoporosis: A review. *World J Orthop* **3** (12): 223-234

Holecki M., Chudek J., Titz-Bober M., Więcek A., Zahorska-Markiewicz B., Duława J. (2012), Changes in bone mineral density in obese perimenopausal women during 5-year follow-up. *Pol Arch Med Wewn*. **122** (4): 139-147.

Hong X., Hsueh Y., Terwedow H., Tang G., Liu X., Jiang S., Xu X., Xu X. (2007), Association of the Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and fracture risk in Chinese postmenopausal women. *Bone*. March **40**(3): 737–742

Honig S., Chang G. (2012), Osteoporosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* **70**(3):140-4

International Osteoporosis Foundation (2011), <http://www.iofbonehealth.org> (site consultado a 20/11/2011)

Jeon Y.K., Lee J.G., S.S. Kim, B.H. Kim, Kim S-J., Kim Y.K., Kim I.J. (2011) Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Endocrine Journal*, **58** (2), 87-93

Khajuria D.K., Razdan R., Mahapatra D.R. (2011), Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev Bras Reumatol* **51**(4):365-82

Kiel D.P., Demissie S., Dupuis J., Lunetta K.L., Murabito J.M., Karasik D. (2007) Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Medical Genetics*, **8**(Suppl 1):S14

Kim K., Shin D., Lee S., Im J., Lee D. (2010), Relation between Obesity and Bone Mineral Density and Vertebral Fractures in Korean Postmenopausal Women. *Yonsei Med J* **51**(6):857-863

Ko M.K.C., Ikeda S., Mieno-Naka M., Arai T., Zaidi S.A.H., Sato N., Muramatsu M., Sawabe M. (2012) Association Of COMT Gene Polymorphisms with Systemic Atherosclerosis in Elderly Japanese. *J Atheroscler Thromb* **19**:552-558

Koh J., Lee Y., Kim Y.S., Kim D.J., Kim H., Park J., Lee K., Kim G.S. (2006), Homocysteine Enhances Bone Resorption by Stimulation of Osteoclast Formation and Activity Through Increased Intracellular ROS Generation. *J Bone Miner Res* **21**:1003–1011.

Li G.F., Pan Y.Z., Sirois P., Li K., Xu Y. J. (2012), Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications. *Osteoporos Int* **23**:2403 – 2408

Liu S., Yan H., Hou W., Xu P., Tian J., Tian L., Zhu B., Ma J., Lu S. (2009), Relationships between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and osteoporosis in postmenopausal women. *J Zhejiang Univ Sci B* **10**(8):609-618

Lorentzon M., Eriksson A.L., Mellstro D., Ohlsson C. (2004), The COMT val158met Polymorphism Is Associated With Peak BMD in Men. *J Bone Miner Res* **19**:2005–2011

Lorentzon M., Eriksson A.L., Nilsson S., Mellström D., Ohlsson C. (2007), Association Between Physical Activity and BMD in Young Men Is Modulated by *Catechol-O-Methyltransferase* (COMT) Genotype: The GOOD Study. *J Bone Miner Res* **22**:1165–1172

Malaspina T.S.S, Zambuzzi W.F., dos Santos C.X., Cmapanelli A.P., Laurindo F.R.M., Sogayar M.C., Granjeiro J.M. (2009), A possible mechanism of low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) activity modulation by glutathione action during human osteoblast differentiation. *Archives of Oral Biology* **54**: 642-650.

Manolagas S.C., Kousteni S., Jilka R.L. (2002) Sex Steroids and Bone. *Recent Prog Horm Res* **57**: 385-409

Marini F., Brandi M.L. (2010), Genetic Determinants of Osteoporosis: Common Bases to Cardiovascular Diseases?, *International Journal of Hypertension*, **10**.4061/2010/394579

Martins M.F.A.E., Carvalho R., Alves M., Ferreira C.A.M.S., Bicho M.D.P. (2008), Polimorfismos genéticos da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP): sua relação com o fenótipo enzimático eritrocitário em doentes com Lúpus Eritematoso. *Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia - Acta Reumatol Port.* **33**:177-187

Matsuo K., Irie N. (2008), Osteoclast–osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**:201–209

McLeod K.M., Johnson C.S. (2011), A Systematic Review of Osteoporosis Health Beliefs in Adult Men and Women. *Journal of Osteoporosis* 10.4061/2011/197454

Meier C., Kraenzlin M.E. (2011), Calcium supplementation, osteoporosis and cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly.* **141**:w13260

Migliaccio S., Greco E.A., Fornari R., Donini L.M., Lenzi A. (2011), Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*: **4** 273–282

Monteiro, C.P., Cabaça, R., Moreira, H., Baptista, M.F., Laires, M.J., Bicho M, Sardinha, L.B. (2012), Susceptibilidade para o desenvolvimento de osteoporose: estudo de associação com os polimorfismos da catecol-O-metil transferase. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* **7(2)**:81.

NCBI – National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>, consultado a 18 de Setembro de 2012.

Osako M.K., Nakagami H., Koibuchi N., Shimizu H., Nakagami F., Koriyama H., Shimamura M., Miyake T., Rakugi H., Morishita R. (2010), Estrogen Inhibits Vascular Calcification via Vascular RANKL System - Common Mechanism of Osteoporosis and Vascular Calcification. *Circ Res.* **107**:466-475.

Prentice A. (2004), Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutrition*: **7(1A)**, 227–243

Qin X., Peng Q., Qin A., Chen Z., Lin L., Deng Y., Xie L., Xu J., Li H., Li T., Li S., Zhao J. (2012) Association of COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Diagnostic Pathology* **7**:136

Rachner T.D., Khosla S., Hofbauer L.C. (2011), New Horizons in Osteoporosis. *Lancet.* **377(9773)**: 1276–1287



Refsum H., Nurk E., Smith A.D., Ueland P.M., Gjesdal C.G., Bjelland I., Tverdal A., Tell G.S., Nygard O., Vollset S.E. (2006), The Hordaland Homocysteine Study: A Community-Based Study of Homocysteine, Its Determinants, and Associations with Disease. *J. Nutr.* **136**: 1731S–1740S

Schwetz V., Pieber T., Obermayer-Pietsch B. (2012), The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. *European Journal of Endocrinology* **166**:959–967

Semmler A., Moskau S., Lutz H., Meyer P., Linnebank M. (2011), Haplotype analysis of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c.1298A>C (E429A) polymorphism. *BMC Research Notes* **4**:439

Souto J.C., Blanco-Vaca F., Soria J.M., Buil A., Almasy L., Ordoñez-Llanos J., Martín-Campos J.M., Lathrop M., Stone W., Blangero J., Fontcuberta J. (2005), A Genomewide Exploration Suggests a New Candidate Gene at Chromosome 11q23 as the Major Determinant of Plasma Homocysteine Levels: Results from the GAIT Project. *Am. J. Hum. Genet.* **76**:925–933

Stolk L., van Meurs J.B.J., Jhamai M., Arp P.P., van Leeuwen J.P.T., Hofman A., de Jong F.H., Pols H.A.P., Uitterlinden A.G. (2007), The Catechol-O-Methyltransferase Met158 Low-Activity Allele and Association with Nonvertebral Fracture Risk in Elderly Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **92**(8):3206–3212

Teruel M., Martin J., González-Juanatey C., López-Mejias R., Miranda-Fillooy J.A., Blanco R., Balsa A., Pascual-Salcedo D., Rodriguez-Rodriguez L., Fernández-Gutierrez B., Ortiz A.M., González-Alvaro I., Gómez-Vaquero C., Bottini N., Llorca J., González-Gay M.A., Martin J. (2011), Association of acid phosphatase locus 1\*C allele with the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research & Therapy* **13**:R116

Wilder J.A., Hammer M.F. (2004), European ACP1\*C Allele Has Recessive Deleterious Effects on Early Life Viability. *Hum Biol.* December; **76**(6): 817–835

Yazdanpanah N., Uitterlinden A.G., Zillikens M.C., Jhamai M., Rivadeneirs F., Hofman A., de Jonge R., Lindermans J., Pols H.A.P., van Meurs J.B. (2007), Low dietary Riboflavin but Not Folate Predicts Increased Fracture Risk in Postmenopausal Women Homozygous for the MTHFR 677 T Allele. *J Bone Miner Res* **23**:86-94

Yilmaz N. (2012), Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Arch Med* 8, **1**: 138-153.

Zambuzzi W.F., Granjeiro J.M., Parikh K., Yuvaraj S., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V. (2008), Modulation of Src Activity by Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase During Osteoblast Differentiation. *Cell Physiol Biochem* **22**:49

